



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ACCIÓN DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL
HIPOTÁLAMO (NPV)
SOBRE LA ACTIVIDAD DE NEURONAS DEL NÚCLEO
TRIGÉMINO DE LA RATA

Tesis presentada como requisito para

obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MARIANA PÉREZ MEDINA

DIRECTOR:

DR. MIGUEL CONDÉS LARA



Noviembre, 2016

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA) por el apoyo financiero otorgado para el proyecto: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 200 415.

Agradezco el apoyo financiero al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de ayudante de Investigador Nacional Nivel III.

Agradecimientos

Al Dr. Miguel Condés Lara por su generosidad al abrirme las puertas de su laboratorio, por su permanente guía y enseñanza, de igual manera por haberme facilitado siempre los medios necesarios para poder llevar a cabo y concluir este trabajo, el cual no habría podido concretarse sin su excelente dirección, apoyo y experiencia, así como su disposición incondicional para compartir sus conocimientos y por motivarme para seguir en el fascinante camino de la investigación.

A la Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana por su tiempo para enseñarme las técnicas y la metodología necesaria para realizar este proyecto, así como la revisión del mismo, el cual se vio enriquecido con sus aportaciones. Sus consejos y comentarios fueron clave para dar lo mejor de mí día a día.

A todos los miembros del laboratorio de Dolor y Epilepsia perteneciente al Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla, Querétaro por su compañerismo amistad y apoyo para la realización de esta tesis.

Abreviaturas

BDA Biotina Dextrano Amina

CGRP Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina

DAB Diaminobencidina

FG Fluoro Gold

FR Fluoro Rubí

NPV Núcleo Paraventricular del Hipotálamo

OT Oxitocina

OT-R Receptor a Oxitocina

PB Buffer Fosfatos

PBS Buffer Fosfatos Salinos

Po Núcleo Posterior Talámico

PrV Núcleo Principal Sensorial del Trigémino

SpV Núcleo Espinal Trigeminal

SpVc Núcleo Espinal Trigeminal Caudal

SpVi Núcleo Espinal Trigeminal Interpolar

SpVo Núcleo Espinal Trigeminal Oral

VP Complejo Ventral Posterior del Tálamo

VPL Núcleo Posterolateral del Tálamo

VPM Núcleo Posteriomedial del Tálamo

Índice

Introducción	1
Antecedentes	3
Hipotálamo.....	3
Estructura y papel del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (NPV)	5
Estructura y función del complejo trigeminal	7
Núcleo Principal Sensorial (PrV).....	9
Núcleo espinal Oral (SpVo)	9
Núcleo espinal Interpolar (SpVi)	9
Núcleo espinal Caudal (SpVc).....	10
Tálamo.....	11
Núcleo Posteriomedial del Tálamo (VPM).....	14
Oxitocina y su receptor	15
Planteamiento del problema	17
Hipoótesis	18
Objetivos	18
General.....	18
Específicos	18
Metodología.....	19
Inyección de los Trazadores neuronales	19
Perfusión.....	20
Cortes Histológicos.....	20
Análisis Histológico	21
Trazado digital de los cortes y conteo celular	22
Resultados.....	23
Sitios de inyección	23
Proyección del Núcleo Espinal Trigeminal (SpV) al núcleo VPM del Tálamo.	25
Digitalización y cuantificación de células positivas a FG en SpV	25
Conteo celular en el complejo SpV	28
Proyecciones del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV) al Núcleo Espinal Trigeminal Caudal (SpVc).....	32
Inmunofluorescencia.....	33
Vía descendente de oxitocinérgica	33

CGRP y OT en el SpVc	34
Región rostro dorsal.....	34
Región caudal dorsal.....	35
Discusión.....	36
Conclusión	42
Bibliografía	43

Resumen

El dolor se describe como un mecanismo de protección para el organismo, sin embargo, esta respuesta no siempre se puede lograr por completo dando lugar al dolor crónico. Esta situación se puede encontrar en las neuralgias del trigémino, condición que se caracteriza por la presencia de dolor repentino y recurrente de alguna, o de todas las ramas del V par craneal o nervio trigeminal, lo que se estima que 1 de cada 15,000 personas presentan. Aunque hoy en día existen diferentes tratamientos para el dolor, hay mecanismos analgésicos endógenos que son parte de una respuesta que el mismo sistema nervioso central (SNC) desencadena.

En este trabajo se analiza un sistema endógeno, el cual implica diversas estructuras y grupos neuronales. Dentro de los mecanismos de este sistema se encuentra la liberación de oxitocina, que es un neuropéptido capaz de inducir analgesia a través de diversos procesos fisiológicos y psicológicos, la liberación de este péptido se lleva a cabo en el hipotálamo, en el Núcleo Paraventricular (NPV) que es un área encargada de las respuestas homeostáticas de los organismos y que se sabe que activa la respuesta inhibitoria al dolor.

De esta forma, la oxitocina es parte de las sustancias que juegan un papel importante dentro de los mecanismos endógenos del dolor, por tal motivo, es importante determinar la vía que sigue el NPV al Núcleo Espinal Trigeminal Caudal (SpVc) y determinar si ésta región contiene al péptido oxitocina. Además, en el presente estudio se desea ver si ésta vía es parte de una regulación que sigue un trayecto del SpVc al Núcleo Posteromedial del Tálamo (VPM).

El objetivo de la presente tesis es estudiar la vía NPV al núcleo espinal trigeminal en su región caudal (SpVc) que puede actuar sobre neuronas que envíen sus proyecciones al VPM, núcleo talámico de relevo de la información sensorial. Asimismo los receptores de oxitocina implicados en las vías NPV-SpV como posible evidencia de un mecanismo inhibitor del dolor causado por las neuralgias del trigémino.

Los resultados de este trabajo se obtuvieron al inyectar a 3 animales con los trazadores FR (Fluoro Rubí) y FG (Fluoro Gold) en el NPV y en el VPM respectivamente, también como parte del trabajo se realizaron las

inmunofluorescencias para oxitocina, su receptor y CGRP.

El trazado anterógrado con el FR, nos permitió demostrar la vía que existe del NPV no sólo al SpVc, sino que también al SpVo y SpVi, donde se encontró también marcaje positivo para oxitocina y para su receptor. Por otra parte, gracias al trazado retrógrado se marcó la vía del SpV al VPM, donde se observó una mayor densidad de células marcadas en el SpVo y SpVi con respecto al SpVc.

Los resultados obtenidos servirán como base del conocimiento de una vía oxitocinérgica que modula la información nociceptiva. Este conocimiento permitirá establecer nuevas metodologías y estrategias para el manejo del dolor y tener una visión global y mejor integrada de este sistema de analgesia endógena

Introducción

El dolor es una experiencia compleja, la cual involucra diversos componentes sensoriales-discriminativos, referentes a una evaluación cognitiva y componentes emocionales y afectivos (Abdallah et al., 2013). Así el dolor se describe como un mecanismo de protección, el cual es necesario para la supervivencia, de tal forma que las respuestas al dolor, tanto comportamentales como sistémicas de los organismos, están encaminadas a hacer desaparecer la fuente que lo causa y a mantener la integridad.

Sin embargo, esta respuesta de protección al dolor no siempre se puede lograr por completo dando lugar al dolor crónico. Esta situación se puede encontrar en casos como las neuralgias del trigémino, condición que se caracteriza por la presencia de dolor punzante, unilateral, severo, repentino y recurrente de alguna, o de todas las ramas del V par craneal o nervio trigeminal (Hernández et al., 2012; Kessinger and Matthews, 2012).

En 1968, Penman estimó que la prevalencia anual de las neuralgias del trigémino era de 4.7 en hombres y 7.2 en mujeres por cada millón (Holle et al., 2010). Esto constituye el 89% de todas las algias faciales, correspondiendo el 10.5% a neuralgias sintomáticas (Kiss et al., 1991). Actualmente se estima que ese número es mucho mayor, siendo 1 de cada 15,000 quienes presentan neuralgia trigeminal y aun así esto no refleja la cantidad real, ya que muchos de quienes la padecen no son diagnosticados (Falaki et al., 2014) o bien no se tiene registro.

Aunque hoy en día existen diferentes tratamientos para el dolor, hay mecanismos analgésicos endógenos que son parte de una respuesta que el mismo sistema nervioso central (SNC) desencadena. En este trabajo se analiza un sistema endógeno, el cual implica diversas estructuras y grupos neuronales. Así, dentro de los mecanismos de éste sistema se encuentra la liberación de oxitocina, que es un neuropéptido capaz de inducir analgesia a través de diversos procesos fisiológicos y psicológicos (Condés-Lara et al., 2007; Tracy et al., 2015). La liberación de este péptido se lleva a cabo en el hipotálamo, en el Núcleo Paraventricular (NPV) que es un área encargada de la respuesta al estrés y que se sabe que activa la respuesta inhibitoria al dolor (Yirmiya et al., 1990). El NPV junto con el núcleo

supraquiasmático son la fuente primaria de oxitocina del SNC (Swanson and Kuypers, 1980; Condés-Lara et al., 2007).

Por esta razón, y como señalamos la oxitocina es parte de las sustancias que juegan un papel importante dentro de los mecanismos endógenos de la modulación del dolor, por tal motivo, es importante determinar la vía que sigue el NPV al núcleo espinal trigeminal en su región caudal (SpVc) y determinar si ésta región contiene al péptido oxitocina. Además en el presente estudio se desea ver si esta vía es parte de una regulación que sigue un trayecto del SpVc al VPM que es un núcleo talámico de relevo de la información sensorial. De ésta forma el objeto de estudio de la presente tesis es la vía NPV al SpVc que puede actuar sobre neuronas que envíen sus proyecciones al VPM dando el aporte sensorial que incluye la estimulación nociceptiva. En esta situación se estudian las vías del NPV al SpVc y la del SpVc al VPM, con este fin se estudian los receptores de oxitocina proveniente del NPV como posible evidencia de un mecanismo inhibidor del dolor causado por las neuralgias del trigémino.

Antecedentes

Hipotálamo

El hipotálamo es un centro integrador de numerosas respuestas, que permiten mantener la homeostasis en el organismo (Horn and Swanson, 2013). El hipotálamo es una estructura bilateral que se desarrolla como parte del sistema límbico, y ocupa las paredes laterales y la parte inferior del tercer ventrículo (figura 1). El hipotálamo se encuentra delimitado por diferentes estructuras como el surco hipotalámico en la parte superior. El quiasma óptico, el tuber cinereum y los cuerpos mamilares en la parte inferior. La lámina terminal en la parte anterior y el tegmentum mesencefálico por la parte posterior, medialmente el tercer ventrículo y lateralmente por la cápsula interna (FitzGerald et al., 2012).

Entre las principales funciones del hipotálamo están: controlar la presión arterial y la composición electrolítica del organismo, regular la temperatura corporal, controlar el metabolismo, regular la reproducción así como la respuesta de emergencia ante el estrés.

El hipotálamo puede dividirse en tres regiones: anterior, media y posterior. Cada parte del hipotálamo tiene grupos celulares especializados que desempeñan distintas funciones.

La parte más anterior del hipotálamo se encarga de la integración de diferentes clases de información y de generar respuestas como son: el control de la presión arterial, de la temperatura corporal, entre otras. Esta estructura se encuentra superpuesta al quiasma óptico, donde se encuentran los núcleos preópticos (núcleo supraquiasmático) y el área preóptica.

El tercio medio del hipotálamo, superpuesto al tallo hipofisario, contiene los núcleos ventromedial, paraventricular (NPV), supraóptico e infundibular.

El tercio posterior del hipotálamo comprende el núcleo tuberomamilar, un grupo celular histaminérgico importante para la regulación de la vigilia y la excitación sexual (Horn and Swanson, 2013).

Debido a que en este trabajo el núcleo de interés es NPV, será la estructura que se definirá con mayor profundidad.

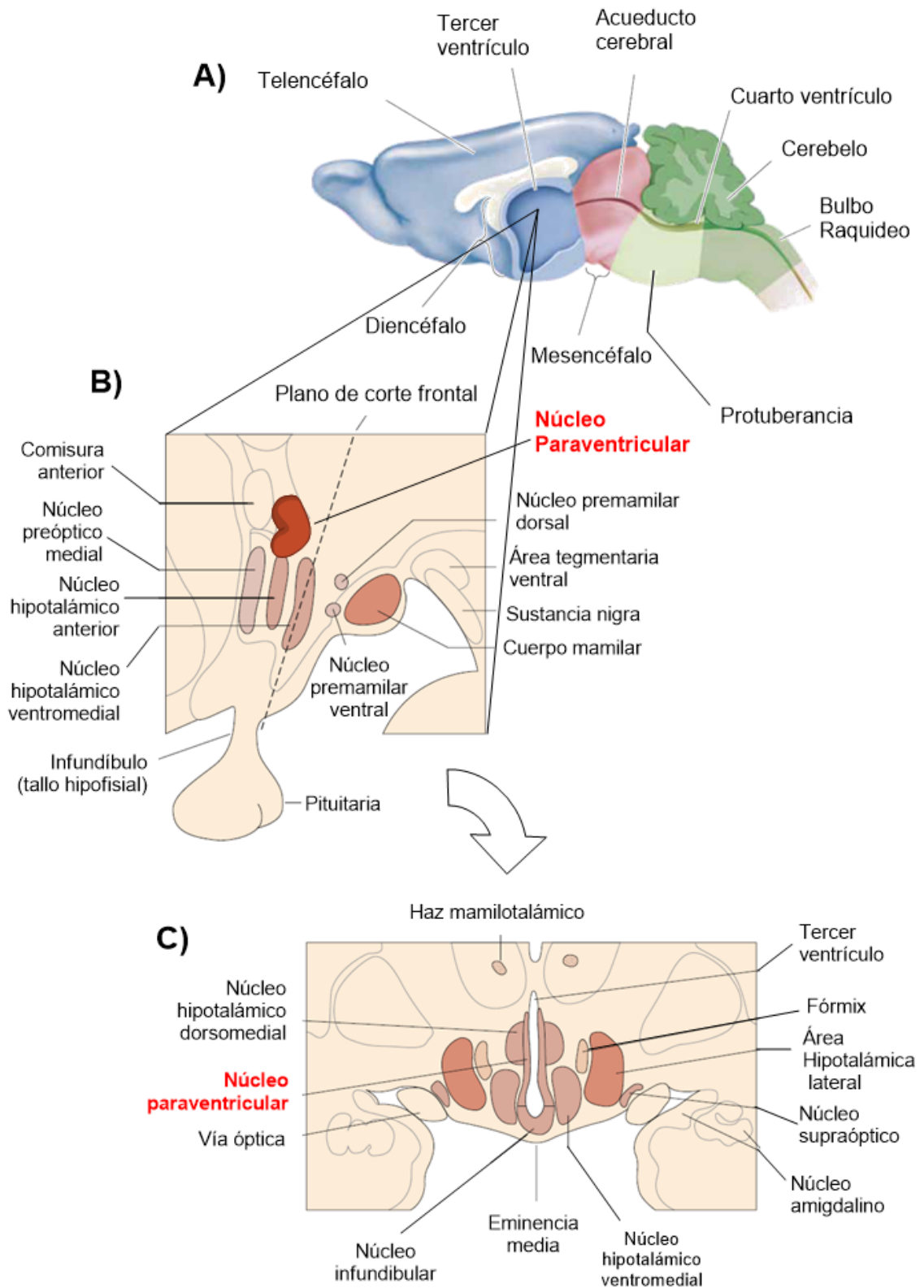


Figura 1. A) Se muestra la ubicación del hipotálamo en el cerebro. B) Representan la ubicación del Núcleo paraventricular en el plano frontal y C) en el plano sagital. Tomado y modificado de Bear et al., 2007a; Horn and Swanson, 2013.

Estructura y papel del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (NPV)

El NPV juega un papel crítico en la integración neuroendócrina y autonómica, actividades que ayudan a mantener la homeostasis en respuesta a los cambios ambientales internos y externos. Estructuralmente hablando, el NPV es una de las estructuras más complejas y con mayor heterogeneidad en el cerebro (Horn and Swanson, 2013).

El NPV comprende los componentes magnocelular y parvocelular neuroendocrinos que controlan la adenohipófisis y la neurohipófisis, como se ilustra en la Figura 2.

Los grupos celulares en el NPV de la rata, se dividen en tres tipos que son:

- Neuronas neuroendócrinas magnocelulares, las cuales envían sus axones directamente al lóbulo posterior de la glándula pituitaria y secretan vasopresina u oxitocina a la circulación (Biag et al., 2012).
- Neuronas neuroendócrinas parvocelulares, las cuales sintetizan y secretan una variedad de hormonas que liberan o inhiben a las hormonas como la corticotropina (Biag et al., 2012).
- Neuronas preautonómicas descendentes, que envían proyecciones al puente o a la médula espinal y que probablemente están involucradas en regular los sistemas simpático y parasimpático (Biag et al., 2012).

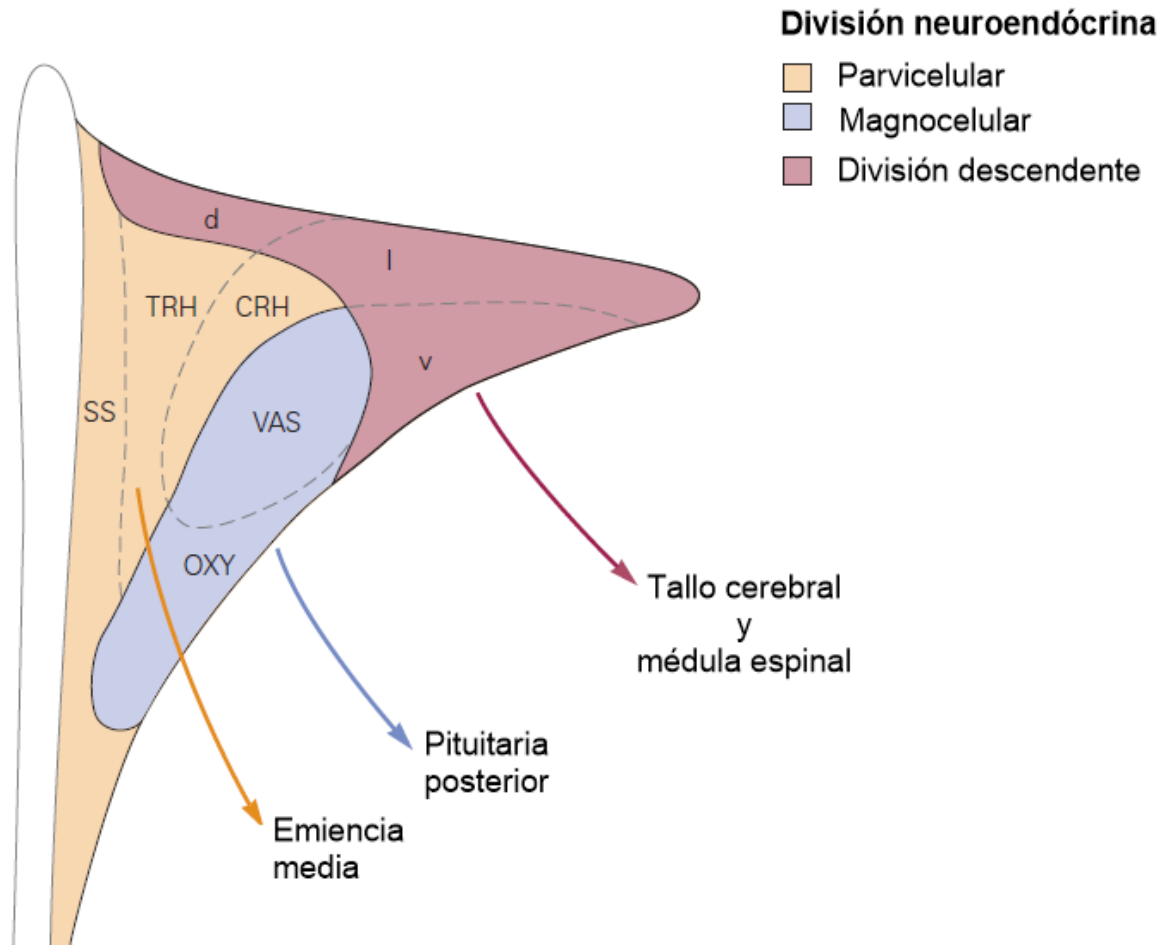


Figura 2. Se muestra el núcleo paraventricular del hipotálamo, en el cual, sus poblaciones celulares producen oxitocina (OXY) y vasopresina (VAS), que son secretadas hacia la sangre por medio de la neurohipófisis. Las neuronas neuroendocrinas parvocelulares tienen 3 componentes neuronales: neuronas de somatostatina (SS) que van a lo largo de la pared del tercer ventrículo, neuronas liberadoras de tirotrópica (TRH) que están concentradas en su mayoría lateralmente y hormonas liberadoras de corticotropina (CRH) las cuales son aún más laterales. La división descendente está compuesta de 3 partes: dorsal (d), lateral (l) y ventral (v) la cual cuenta con proyecciones topográficas hacia el tallo cerebral y la médula espinal. Tomado y modificado de Horn and Swanson, 2013.

Estructura y función del complejo trigeminal

El sistema sensorial trigeminal está relacionado con el procesamiento de los estímulos provenientes de la cara y de la cabeza hacia las vías centrales (Waite, 2015). Además, está relacionado con la transmisión continua de información que ayuda a mantener la integridad de las regiones craneofaciales. Por otra parte, también se encarga de transmitir los impulsos nociceptivos (Koltzenburg et al., 2013).

Los impulsos nerviosos convergen en las vías somatosensoriales craneales que procesan la información nociceptiva hacia el cerebro y se originan en los receptores periféricos, el complejo del ganglio trigeminal y la parte anterior de los neurómeros cervicales superiores (Koltzenburg et al., 2013).

Según su localización, los tejidos craneales pueden ser inervados por una de las tres ramas del nervio trigémino que son oftálmica, maxilar y mandibular (Waite, 2015). Estas ramas constituyen las vías aferentes primarias que transportan los impulsos nociceptivos provenientes del exterior (Koltzenburg et al., 2013). La información somatosensorial de éstas tres ramas viaja desde el nervio trigémino al complejo nuclear del trigémino de donde se conecta a otras estructuras del cerebro (Guy et al., 2005).

Los estímulos nociceptivos provenientes de las terminales periféricas del quinto par craneal, o trigeminal, convergen en las neuronas ganglionares trigeminales (ganglio de Gasser), localizadas en la base del cráneo. Ahí, se presenta una organización somatotópica común en los mamíferos, donde las células oftálmicas están en la parte anteromedial, las mandibulares en la posterolateral y las maxilares en la parte medial. Los procesos o proyecciones nerviosas provenientes de éstas aferentes primarias entran a través del tallo cerebral por medio del tracto trigeminal de forma dorsal y lateral (figura 3). Después de entrar en este tracto, la mayoría de las aferentes pasan caudalmente emitiendo señales colaterales que terminan en la subdivisión del núcleo espinal trigeminal (SpV) y a la parte superior de las cervicales para activar a las neuronas de segundo orden, algunas de las fibras continúan por una ramificación hacia el Núcleo Principal sensorial (PrV) (Waite, 2015).

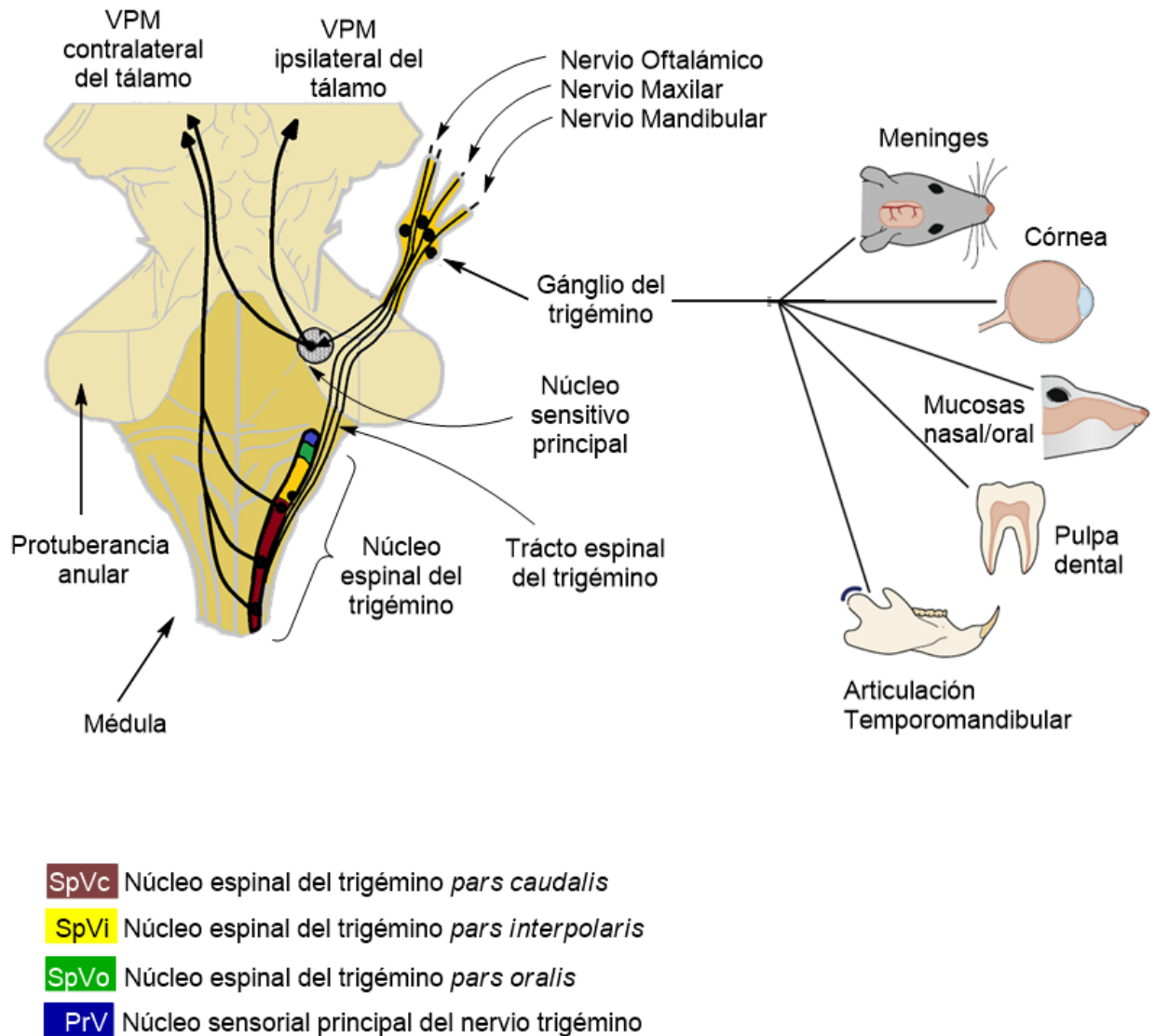


Figura 3. Representación del complejo espinal trigeminal con los distintos núcleos que los conforman, así como sus aferentes y sus proyecciones. Tomado y modificado de Swenson, 2006; Koltzenburg et al., 2013.

Desde la parte rostral a la caudal, el complejo trigeminal sensorial se compone de diferentes divisiones como son: el Núcleo Principal sensorial del trigémino (PrV) y el núcleo espinal trigeminal (SpV), este último a su vez se subdivide en los núcleos Oral (SpVo), Interpolar (SpVi) y Caudal (SpVc), (Guy et al., 2005).

Cada una de estas divisiones se caracteriza por tener proyecciones a diferentes áreas, aunque la mayoría son predominante ipsilaterales que poseen

citoarquitecturas propias y segregan sustancias químicas particulares (Waite, 2015).

En las distintas vías aferentes de los núcleos podemos encontrar generalmente glutamato, en las diferentes aferentes mielinizadas, así como pequeñas fibras que contienen CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y sustancia P, siendo particularmente denso en las láminas I y II del SpVc, esta misma región, tiene sinapsis hacia fibras aferentes tipo GABAérgicas, y Óxido Nítrico Sintasa (NOS) (Waite, 2015).

Núcleo Principal Sensorial (PrV)

Se encuentra lateralmente al puente troncoencefálico y tiene forma de cacahuete en su parte coronal, contiene una alta densidad de neuronas pequeñas y medianas, las cuales pueden contener glutamato, GABA o glicina (Waite, 2015).

Las respuestas evocadas de PrV son generalmente ipsilaterales, provenientes de la piel, los dientes y de las vibrisas. Este núcleo presenta proyecciones al núcleo talámico ventral postero medial (VPM) (Waite, 2015).

Núcleo espinal Oral (SpVo)

Este subnúcleo contiene células largas que van de los 30 a los 50 μm , con arborizaciones dendríticas extensas. Está relacionado con reflejos orofaciales y conductuales, y tiene proyecciones al núcleo del hipogloso (Waite, 2015).

Núcleo espinal Interpolar (SpVi)

Se extiende desde la parte anterior del núcleo caudal hasta la parte baja del obex, es el subnúcleo más ancho y contiene neuronas en su mayoría pequeñas y medianas. Sus células contienen GABA o glicina, así como parvoalbúmina o calbindina. Sus proyecciones van al VPM y al núcleo posterior del tálamo (Po) (Waite, 2015).

Núcleo espinal Caudal (SpVc)

Esta región se extiende desde el nivel del obex hacia la parte anterior de la cervical dorsal, con la cual además de ser continua, comparte un arreglo laminar similar (Waite, 2015). Ambas estructuras contienen neuronas nociceptivas en las láminas I, II y V, muchas de las cuales tienen proyecciones a otras estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento del dolor como es el caso del tálamo (Guy et al., 2005).

Las láminas que constituyen esta región son: la lámina I que es una capa marginal y lámina II que está formada por sustancia gelatinosa y ambas constituyen las láminas superficiales, también hay unas capas magnocelulares más profundas que son la III, la IV y en algunas divisiones se considera que existe una lámina V (Waite, 2015).

Las respuestas nociceptivas ocurren principalmente en las láminas I, II y V e incluyen patrones de activación específicos de amplio rango dinámico y nociceptivo específico. A pesar de que SpVc tiene un papel en la nocicepción craneal, también es encargado de proyectar internuclearmente a todos los otros núcleos trigeminales, lo cual es importante para modular las respuestas nociceptivas e inocuas a niveles rostrales (Waite, 2015).

Tálamo

El tálamo es una estructura central que es la principal estación de relevo de la información sensorial antes de llegar a la corteza cerebral. En el tálamo hay una representación, en diferentes núcleos, de la información motora, visual, auditiva, somática y en el caso particular también de la sensación del dolor. Es de esta forma en que el tálamo está involucrado en el procesamiento de la información nociceptiva o de dolor antes de llegar a diferentes partes de la corteza cerebral (Ab Aziz and Ahmad, 2006).

Al igual que en la mayoría de los vertebrados, en el caso de la rata, el tálamo conforma la mayor parte del diencefalo y se encuentra dividido en varios núcleos, cada uno con características citoarquitectónicas y funciones particulares (Groenewegen and Witter, 2015).

Aunque existen distintas clasificaciones acerca de la estructura y función del tálamo, hay una organización que es considerada clásica; ésta se basa en los diferentes tipos de información que es transmitida a través de cierto núcleo o núcleos hacia la corteza (Groenewegen and Witter, 2015).

Según su anatomía y función, se puede dividir al tálamo, en tres grupos:

- Los núcleos principales o de relevo
- Los núcleos de asociación
- Los núcleos intralaminares o de la línea media.

Dichos grupos a su vez presentan características distintas entre sí y cada uno presenta diversos grupos que se enlistan a continuación.

Los grupos principales o de relevo se encargan de recibir la información motora y sensorial primaria a través de vías ascendentes que transmiten la información hacia áreas discretas y a diferentes regiones de la corteza cerebral (figura 4). Entre estos grupos principales o de relevo se encuentran:

- El complejo del núcleo geniculado lateral (visual)
- El núcleo geniculado medio (auditivo)
- El núcleo ventro posterior medial (somato sensorial de la cara)
- El núcleo ventral posterolateral (somato sensorial del cuerpo)
- El núcleo posterior (discriminación sensorial)

- El núcleo ventral anterior (motor)
- El núcleo ventral medial

El segundo grupo lo conforman los núcleos de asociación, los cuales reciben la información de aferentes mayores de la capa V de las células piramidales de la corteza sensorimotora y que funcionan como relevo de esta información hacia las áreas asociativas de la corteza. Estos núcleos están conformados por:

- El núcleo mediodorsal
- Los núcleos anteriores (anterodorsal, anteroventral, y anteromedial)
- El núcleo submedial
- Los núcleos laterodorsal y lateralposterior

Y finalmente, los núcleos intralaminares o de la línea media, los cuales se clasifican como un grupo independiente, basados en su distinta localización a lo largo de la línea media y dentro de la lámina medular interna, su distribución sustancial hacia áreas corticales y subcorticales promueve que estén involucrados con los procesos de excitación y atención pero también presentan respuestas ante estímulos nociceptivos. Los núcleos que lo conforman son:

- Núcleo paratenial
- Núcleo paraventricular
- Núcleo romboidal
- Núcleo reuniens
- Núcleo central lateral
- Núcleo centro mediano

Además, en algunas ocasiones también se considera al núcleo Intermedio dorsal parte de este grupo (Groenewegen and Witter, 2015).

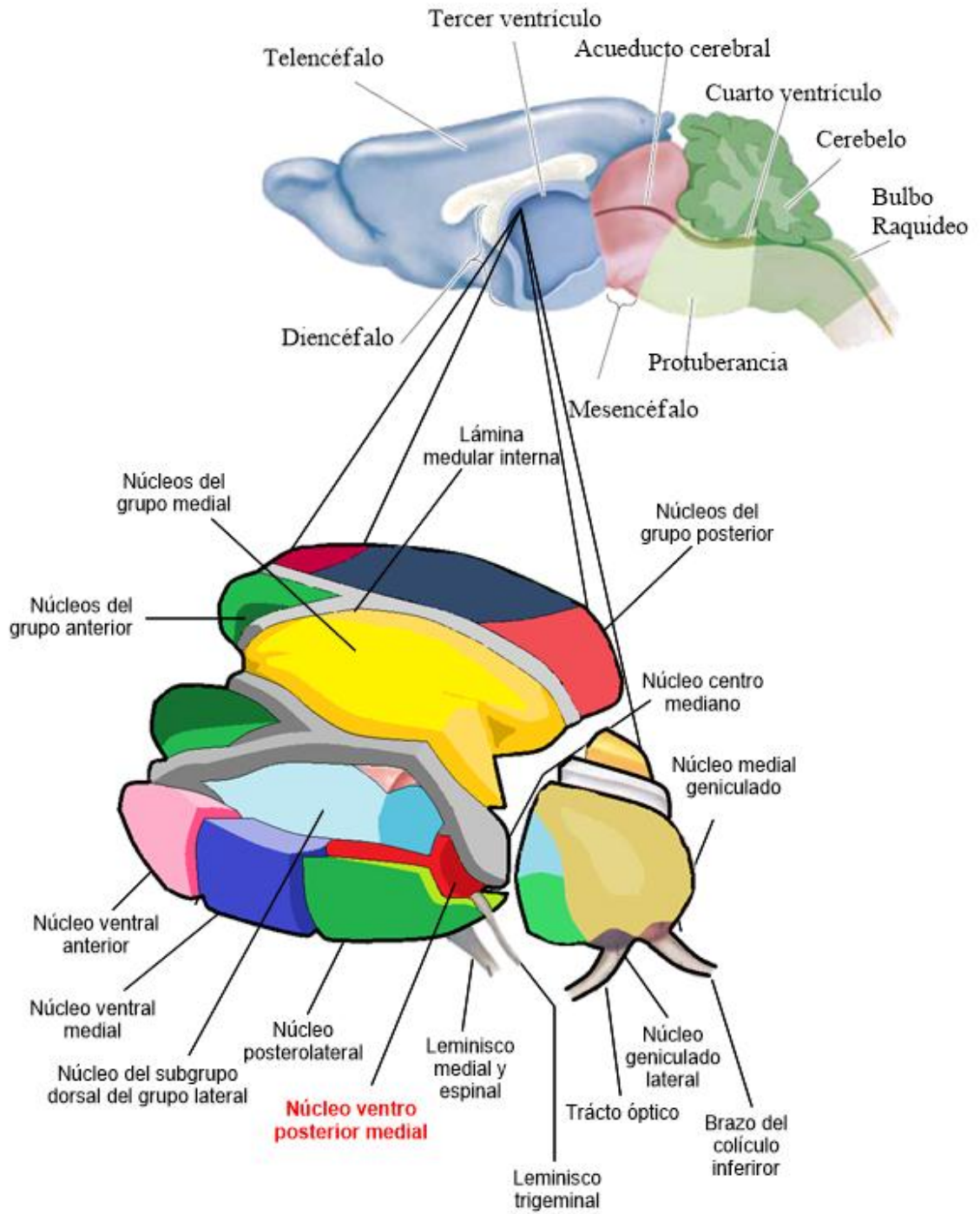


Figura 4. Se muestra un esquema con las diferentes divisiones del tálamo, así como la ubicación de esta estructura en el cerebro. Tomado y modificado de Bear et al., 2007; Netter, 2010; Horn and Swanson, 2013.

Debido a que en este trabajo la región de interés es el complejo ventral posterior, en específico el núcleo posteriomedial (VPM), será la estructura que definiremos a continuación.

El complejo ventroposterior en las ratas, ocupa el área ventrolateral del tálamo, este complejo está rodeado ventralmente y lateralmente por el lemnisco medio y el núcleo reticular del tálamo y dorsomedialmente por el complejo posterior.

Este complejo es el sitio de relevo de la información sensorial que se dirige a la corteza y puede ser dividido en tres partes principales: El núcleo ventral posterolateral (VPL), que recibe información somatosensorial de la médula espinal, el núcleo ventral posteriomedial (VPM) que recibe información somatosensorial del sistema trigeminal y una región medial, formada por células parvicelulares (pequeñas), que es el relevo talámico principal para los aferentes viscerales y gustatorios (Groenewegen and Witter, 2015).

Núcleo Posteriomedial del Tálamo (VPM)

El VPM tiene niveles más bajos de acetilcolinesteras (AChE) y contiene a sus células altamente empaquetadas en comparación con el VPL. La mayoría de sus neuronas son de tamaño mediano y tienen proyecciones talamocorticales, a diferencia de otras especies, en el caso de las ratas no se ha reportado que estas neuronas sean GABAérgicas (Sherman and Guillery, 2006).

Estructuralmente hablando, el VPM está organizado en grupos o agregados de células que representan de manera individual a las vibrisas, estas estructuras son más fáciles de distinguir en ratas jóvenes que en adultas. Los axones talamocorticales del VPM terminan predominantemente en la capa IV de la corteza primaria sensorial (S1) y utilizan como neurotransmisor glutamato (Kharazia and Weinberg, 1994). También los axones se conectan a las capas I y V/VI de la S1 (Lu and Lin, 1993; Zhang and Deschênes, 1998).

Por otra parte, el nervio principal del trigémino (PrV), así como el espinal (SpV), desde sus diferentes regiones como el SpVo y SpVc, proyectan hacia el VPM (Guy et al., 2005; Paxinos, 2014). Las regiones que responden a las vibrisas en estos nervios dan lugar a tres vías involucradas en la transmisión de información,

que van desde el tallo cerebral, pasando a través del tálamo, para que, finalmente, alcancen su destino en la corteza. Las tres vías principales son la vía lemnisco, la extralemnisco y la paralemniscal.

La vía lemnisco se origina en las neuronas del PrV, las cuales alcanzan la parte dorsomedial del VPM y de ahí proyectan hacia la corteza somatosensorial primaria (S1).

La vía extralemnisco surge de las células del SpVc que proyectan hacia la parte ventrolateral del VPM y, posteriormente, a la corteza somatosensorial secundaria (S2) y hacia el septo de S1.

La vía paralemnisco se origina en la parte rostral del SpV interpolares y proyecta hacia la parte medial del Po y después hacia la corteza, principalmente a las capas I y V (Waite, 2015).

Oxitocina y su receptor

La oxitocina es un péptido formado por nueve aminoácidos en una estructura cíclica, este nonapéptido es sintetizado en el núcleo paraventricular y aunque en un principio se pensaba que solamente participaba en la estimulación de las contracciones uterinas y en la eyección de la leche después del nacimiento (Baribeau and Anagnostou, 2015) hoy en día se sabe que participa en muchos otros procesos del organismo, siendo su papel como modulador del dolor el que nos interesa.

En un principio se sabía que la oxitocina presentaba receptores en diversos tejidos como miometrio (Crankshaw et al., 1978; Fuchs et al., 1983), endometrio (Roberts et al., 1976; Riley et al., 1995), ovario (Furuya et al., 1995), entre otras estructuras relacionadas.

El receptor de oxitocina es un receptor acoplado a proteínas G de tipo rodopsina (Gimpl and Fahrenholz, 2001), que forma parte de la gran familia de siete dominios transmembranales de alfa-hélices conectados por medio de asas extra e intracelulares.

Este receptor está implicado en el reflejo de eyección durante la lactancia (Ruis et al., 1981; McNeilly et al., 1983; Johnston and Amico, 1986) y la contracción

del músculo uterino durante el parto (Wilson et al., 1990; Pettibone et al., 1995; Williams et al., 1998; Gimpl and Fahrenholz, 2001) como vimos en un principio, pero no sólo se limita a esto, sino que además la oxitocina promueve la diferenciación de los cardiomiocitos, mejora la cicatrización de heridas y modula las respuestas inflamatorias (Paquin et al., 2002; Jankowski et al., 2004; Gouin et al., 2010). Es importante tener en cuenta que a pesar de que se trata del mismo péptido y del receptor, los efectos que tiene la activación de este, varían de acuerdo al órgano y al tejido, así mismo la distribución del receptor varía significativamente dependiendo del modelo animal que se elija, así como de la edad del mismo (Baribeau and Anagnostou, 2015)

Uno de los mecanismos por los cuales se piensa que la oxitocina actúa, es que al activar sus receptores genera la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, lo cual lleva a una cascada por activación de proteínas fosforiladoras y de enzimas dependientes de Ca^{2+} como puede ser la activación de la síntasa de óxido nítrico (NOS) que incrementa la concentración de óxido nítrico el cual al difundir hacia otras células promueve la vasodilatación, contracción del músculo liso, transcripción de genes, aumento de la excitabilidad de las neuronas (Baribeau and Anagnostou, 2015).

Por otra parte, ahora se sabe que las interneuronas inhibitorias en el asta dorsal de la médula también presentan receptores a oxitocina (Reiter et al., 1994), participando así en procesos de analgesia, debido a que éstos, a nivel de la red neural se encuentran acoplados a proteínas de tipo $G_{i/o}$ (Busnelli et al., 2012), las cuales de manera general se caracterizan por promover la hiperpolarización de la membrana, evitando así el envío de la señal dolorosa cuando son activados, promoviendo un efecto analgésico (McCudden et al., 2005).

Las neuronas oxitocinérgicas también presentan estos receptores en sus superficies celulares para los neuropéptidos que estas mismas secretan, es por eso que son capaces de modular su propia liberación en un mecanismo de *feedback* (Baribeau and Anagnostou, 2015).

Planteamiento del problema

El dolor representa un grave problema para la población, es por eso que diversos trabajos y estudios centran su objetivo en tratar de entender los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento de éste. Para entender este tipo de alteraciones, es importante estudiar las vías encargadas de procesar esta información en el organismo y de poder encontrar diversos tratamientos que al interferir con esta señal, funcionen como mecanismos anestésicos.

Una de las vías encargadas del procesamiento de la información dolorosa es la de señalización conformada por el complejo trigeminal, y sus interconexiones con núcleos superiores (NPV y VPM) (Guy et al., 2005). Es por eso que en el presente trabajo se estudian las vías de interconexión entre el NPV y el núcleo espinal trigeminal mediante trazadores neuronales, esto debido a que el hipotálamo presenta proyecciones al SpV en su región caudal (SpVc) las cuales se originan del NPV (Abdallah et al., 2013). Estas proyecciones son consideradas predominantemente ipsilaterales, de tal manera que se pueda contar con un soporte neuroanatómico para entender el funcionamiento de un posible efecto analgésico proveniente del NPV.

Además, como se ha reportado anteriormente, las vías del NPV al SpVc y de éste al VPM están relacionadas con el procesamiento de las señales dolorosas, así como de los mecanismos de analgesia endógena que posiblemente estén mediadas por oxitocina. Ahora bien existen diversos estudios en donde se ha analizado como los receptores de oxitocina podrían estar desempeñando un papel fundamental en la percepción y modulación del dolor, en especial del que proviene del complejo trigeminal, pero existe muy poca información al respecto de la expresión de este receptor en el ganglio y en el núcleo trigeminal. Los pocos estudios sobre el receptor a OT se centran en la expresión de éste receptor en otros tejidos como las glándulas mamarias, el endometrio, entre otros (Tzabazis et al., 2015). Por lo que la importancia de este trabajo radica en ampliar la información que se tiene sobre los receptores oxitocinérgicos presentes en estas vías, como una forma de comprender los mecanismos subyacentes de analgesia endógena del organismo.

Hipoótesis

Debido a que el NPV tiene proyecciones al SpV y este último al VPM, las cuales forman parte de las vías de señalización del dolor, se piensa que estas vías son oxitocinérgicas, lo que sería un sistema de inhibición en respuesta a estímulos dolorosos.

Objetivos

General

Establecer mediante el trazado de vías neuronales, la interconexión entre el NPV y el SpVc, así como las proyecciones de esta última estructura hacia el VPM del tálamo y comprobar si estas vías son oxitocinérgicas.

Específicos

- Describir mediante el trazado anterógrado con Fluoro Rubí la vía del NPV del hipotálamo al núcleo espinal del trigémino.
- Demostrar la proyección del núcleo del trigémino al Núcleo VPM del tálamo, por medio del trazador neuronal retrógrado Fluoro Gold.
- Verificar mediante inmunofluorescencia si las fibras que proyectan del NPV al núcleo trigémino son oxitocinérgicas.
- Determinar por inmunofluorescencia si las células que proyectan del núcleo trigémino al VPM del tálamo presentan el receptor a oxitocina.

Metodología

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 280 a 300 gramos, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y ciclos de luz/oscuridad (12-12 hrs), con alimento y agua *ad libitum*.

Inyección de los Trazadores neuronales

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (70/6 mg/Kg, intraperitoneal) y montados en un aparato estereotáxico, donde se expuso el cráneo, al cual se le realizó un trépano y de acuerdo con las coordenadas del atlas de Paxinos and Watson, 1998 se localizaron el VMP (Antero Posterior 5.7 mm, lateral 2.6 mm y altura 4mm, línea interaural) y el NPV (Antero Posterior 7.12mm, lateral 0.3mm y altura 1.9, línea interaural) donde se administraron a presión manual los distintos trazadores con ayuda de una micropipeta de borosilicato unida a una jeringa Hamilton acoplada a un vernier manual y todo esto acoplado a una torre milimétrica de estereotáxico.

El procedimiento para la inyección de los trazadores fue el siguiente: la jeringa con la micropipeta acoplada se llenó de petrolato, después se tomaron 30 nl de pontamina, la cual se utilizó únicamente como indicador visual para la inyección, seguida de 30nl de petrolato que sirvieron de separación entre la pontamina y 60nl del trazador que fue inyectado. En el VPM se inyectó el Fluoro Gold (FG) al 2.5% disuelto en agua destilada y en el NPV, se inyectó Fluoro Rubí (FR) al 5% disuelto en agua destilada o Biotina Dextrano Amina (BDA) al 10% disuelto en NaCl 0.9% según fuera el caso, finalizado esto, se retiró la pipeta, se colocó cera para hueso en el trépano y se procedió a suturar la piel con hilo quirúrgico.

Posterior a la cirugía, a los animales se les dio un periodo de recuperación de 9 a 11 días, para que durante este lapso se efectuara el transporte de los trazadores, transcurrido este tiempo se realizó, bajo anestesia profunda, la perfusión de los mismos.

Perfusión

Para realizar este procedimiento los animales fueron anestesiados con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/Kg), después se realizó una perfusión vía intracardiaca con una solución de NaCl al 0.9% seguida de una solución fijadora compuesta por paraformaldehído (4%) disuelta en Buffer Fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4. A continuación, se extrajeron el cerebro y la médula espinal, los cuales fueron colocados en fijador durante 2 horas posterior a su extracción y finalmente cambiados a una solución de sacarosa al 30% disuelta en Buffer Fosfatos 0.1M.

Cortes Histológicos

El cerebro y el tallo cerebral fueron colocados en un microtomo de congelación (LEICA SM 2000R), se realizó una muesca del lado derecho de la corteza cerebral para poder identificar cada hemisferio, se realizaron los cortes coronales de 40 µm de grosor, se obtuvieron un total de cinco series, de las cuales la primera fue montada inmediatamente en portaobjetos doblemente gelatinizados, después fue deshidratada utilizando un tren de alcoholes (70%, 80%, 96%, 100%) y aclarada con Xilol, finalmente los cortes fueron montados con resina DPX (medio de montaje para microscopía).

La segunda serie fue teñida con violeta de cresilo, siguiendo un tren de hidratación de Xilol, y alcoholes (100%, 96%, 80%, 70%) donde permanecían en cada solución durante 5 minutos, después se les aplicó un lavado de 3 segundos para posteriormente ser teñidos con violeta de Cresilo al 5% durante 5 minutos, pasado este tiempo fueron deshidratados por las mismas sustancias anteriores pero en orden inverso (alcoholes (70%, 80%, 96%, 100%) y Xilol), para finalmente ser montados con resina de Entellan.

La tercera serie fue utilizada para la técnica de inmunofluorescencia para oxitocina y su receptor. En el caso de los cortes con BDA, primero se utilizó un tratamiento de peróxido al 1% durante 30 minutos para inhibir la peroxidasa endógena, después se lavaron con PBS 0.1M, enseguida se realizó una incubación con una solución ABC durante 24hrs, después se hizo otro lavado con PBS 0.1M y

para revelar el BDA se utilizó el KIT DAB (Diaminobencidina) SK-4100. Posteriormente se realizó la técnica de inmunofluorescencia para la oxitocina y su receptor a todos los cortes, independientemente de su trazador, ésta se realizó mediante un coctel de anticuerpos primarios: OT-neurofisisina (PS60 monoclonal anti-ratón dilución 1:250 en PBS 0.1M) y para el receptor anti-OTR (Santa Cruz Biotechnology sc-8103, anti-cabra se realizó una dilución 1:400 en PBS 0.1M), posteriormente se incubaron los cortes durante 24hrs a 4°C y en condiciones de oscuridad, pasado este tiempo, los cortes fueron lavados con PBS 0.1M para ser sometidos al segundo anticuerpo Alexa 488 anti-ratón y Alexa 633 anti-cabra ambos con una dilución de 1:300 en PBS 0.1M con el cual fueron incubados durante 24hrs, posteriormente fueron lavados con PBS 0.1M y se siguió el mismo tren de deshidratación mencionado anteriormente (alcoholes y xilol), para ser montados en portaobjetos gelatinizados con DPX.

Otra de las variantes que se hizo con esta técnica fue hacer la inmunofluorescencia para CGRP y para oxitocina. Se utilizó el anti-conejo CGRP (Chemicon) en una dilución 1:2000 en PBS 0.1M. Las series 4 y 5 fueron guardadas en PB 0.1M.

Análisis Histológico

Para verificar los sitios de inyección con BDA se utilizó un microscopio Leica DMLB óptico. Al revisar la fluorescencia de los tejidos con FR y FG, se utilizó el mismo microscopio con un sistema acoplado de fluorescencia y una cámara digital Leica DF320, así como un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta que cuenta con 4 tipos de láser: Argón/2 que funciona con 4 longitudes de onda: 458, 477, 488 y 515nm, un DPSS de 561nm, un HeNe de 633nm y finalmente un sistema multifotónico coherente-XR entonable que trabaja en un rango de 305-980nm, que se utilizó para detectar los fluorocromos utilizados para cada anticuerpo.

Trazado digital de los cortes y conteo celular

Para realizar el trazado digital de los cortes del complejo SpV, así como su conteo celular, se utilizó el sistema MD3Plot Version 4.0 Accu Stage, el cual es un programa de digitalización (Minnesota Data-Metrics) acoplado al microscopio óptico Leica DMLB gracias a este sistema se realizó el trazado digital de los cortes de SpV y se cuantificaron las neuronas que presentaban FG y que se encontraban dentro de la región de interés, logrando una representación digital del corte original y la localización precisa de las células marcadas dentro del mismo.

Resultados

Sitios de inyección

Fueron inyectadas un total de 16 ratas de las cuales 12 se inyectaron con FG y FR y 4 con BDA y FG. Los resultados de las inyecciones con FG y FR fueron más exitosos, por lo que en este trabajo solo se presentan los resultados relacionados a estos sitios.

Las inyecciones de FR en el NPV y del FG en el núcleo VPM fueron muy semejantes ($n=3$), como se muestran en las fotomicrografías de los sitios de inyección en las figuras 5 y 6.

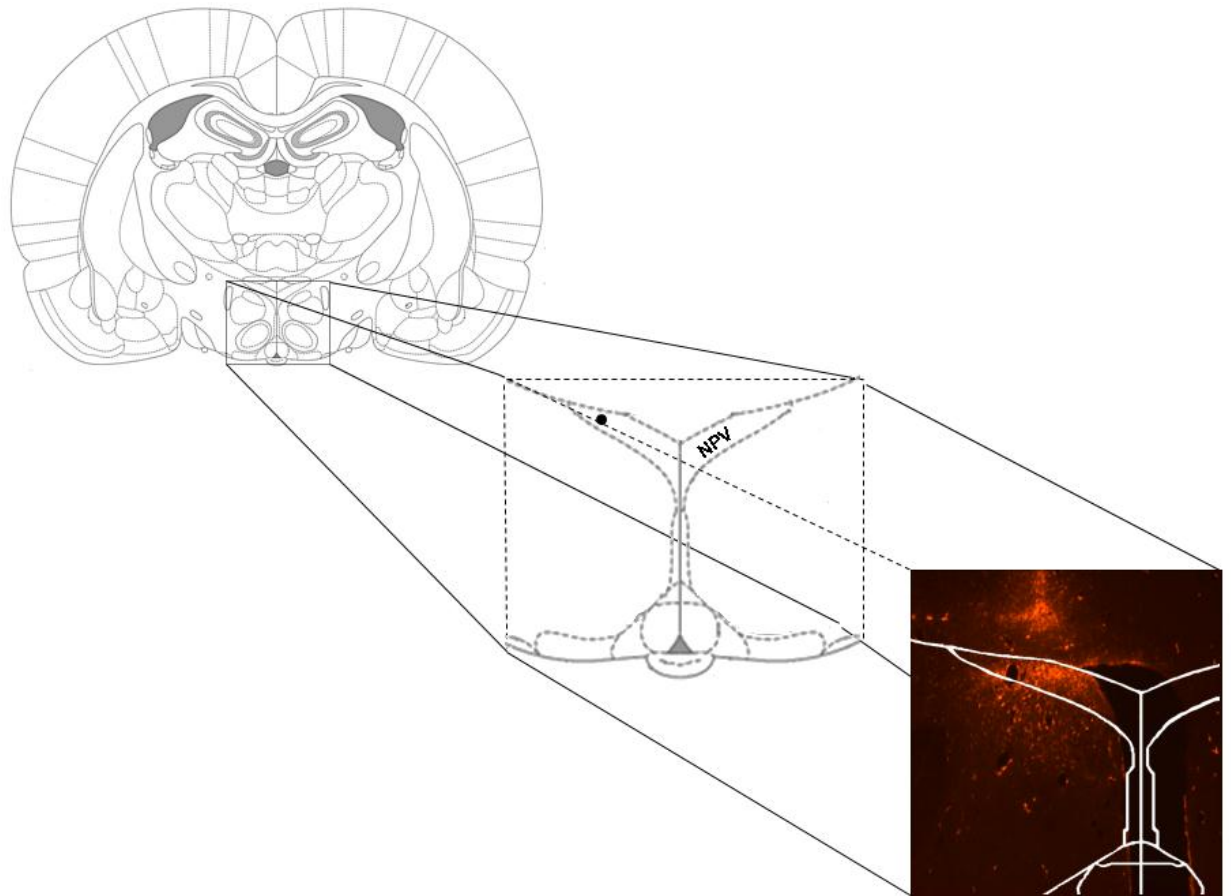


Figura 5. Se muestra un esquema de un corte coronal de un cerebro de rata donde se ubica la región del NPV y a un lado se muestra la fotomicrografía. Nótese cómo el sitio de inyección de FR se encontró dentro del NPV del hemisferio izquierdo de la rata. NPV: Núcleo paraventricular del hipotálamo. Interaural 7.08 mm. Tomado y modificado de Paxinos and Watson, 2007. Aumento 25x.

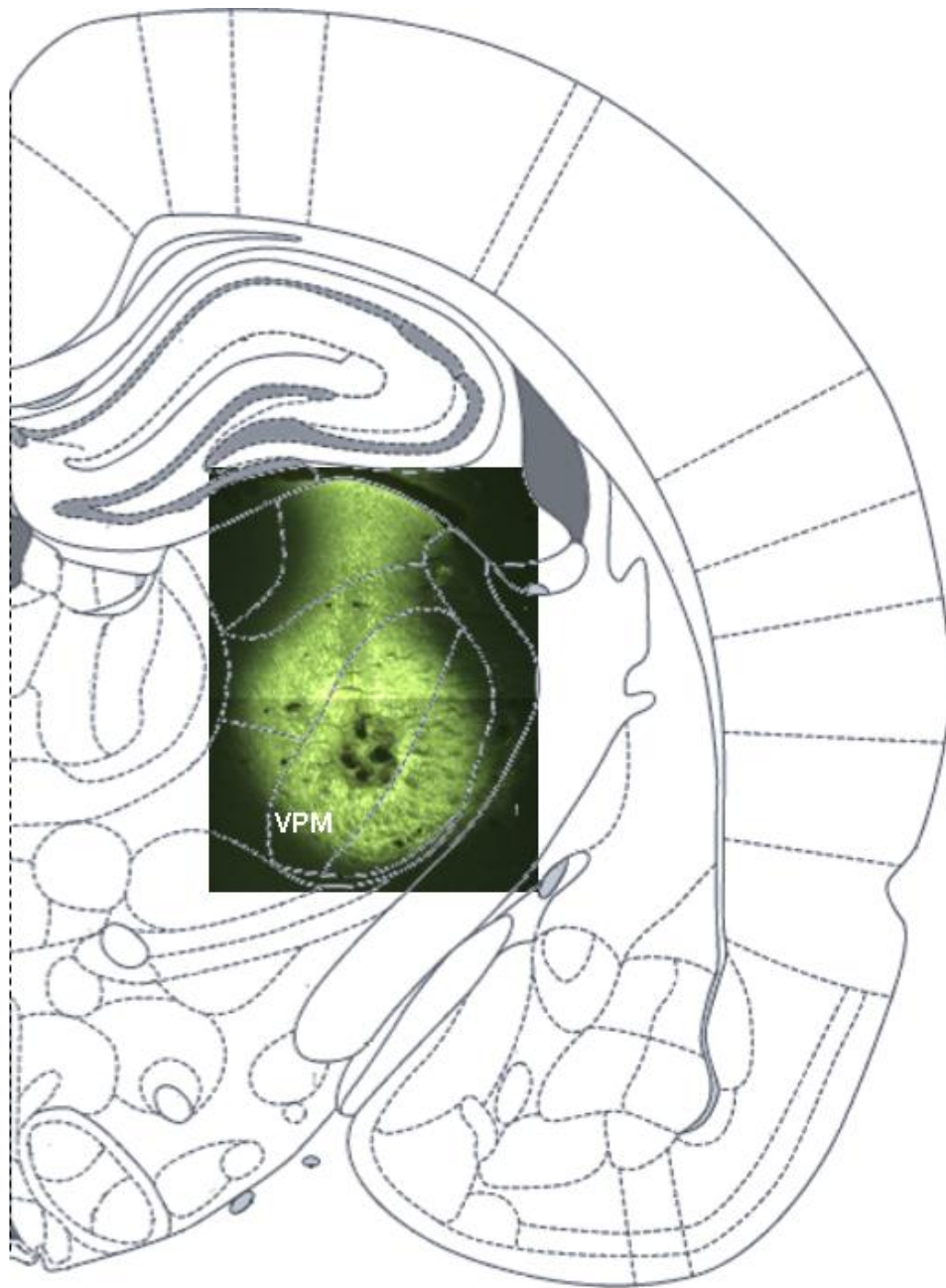


Figura 6. Sitio de inyección en el núcleo VPM donde se inyectó Fluoro Gold (FG) en el hemisferio derecho. Interaural 6.00 mm. Tomado y modificado de Paxinos and Watson, 2007. Fotomontaje a un aumento de 25x.

Además se pudo corroborar que la inyección en el VPM se encontró en el sitio correcto, mediante el análisis de estructuras que envían proyecciones a este núcleo, ya que estructuras como el fascículo cuneatus (cu) y el núcleo cuneatus (Cu) se encontraron densamente marcados en cuerpos celulares con FG como se muestra en la figura 7.

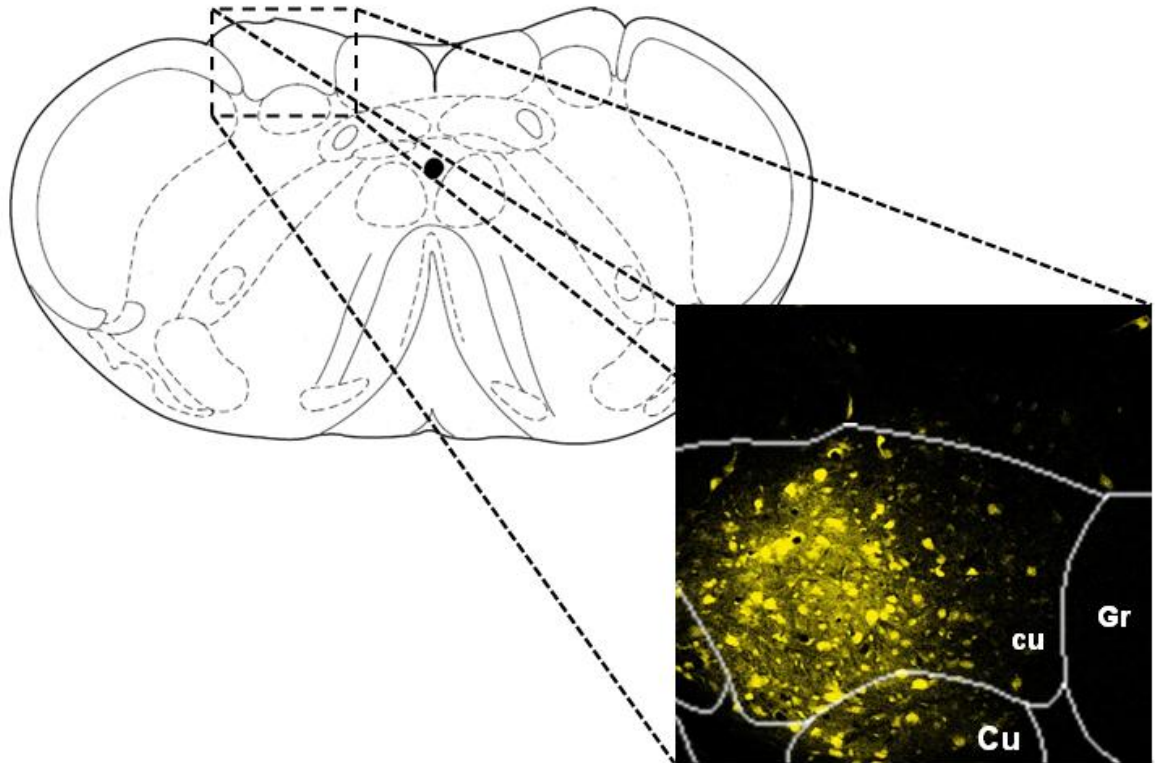


Figura 7. Ejemplifica las células que proyectan del núcleo cuneatus y el fascículo cuneatus hacia el VPM del tálamo de manera contralateral. Abreviaturas: Gr, Núcleo gracilis; cu, fascículo cuneatus; Cu, núcleo cuneatus. Interaural -5.30 mm. Tomado y modificado de Paxinos and Watson, 1998. Aumento 250x.

Proyección del Núcleo Espinal Trigeminal (SpV) al núcleo VPM del Tálamo.

Digitalización y cuantificación de células positivas a FG en SpV

Los cortes a cuantificar en la región SpV, fueron fotografiados mediante epifluorescencia para observar la distribución de células marcadas con FG desde su porción rostral hasta caudal de la misma, tal como se ilustra en la figura 8. Esto

servió como referencia para realizar una digitalización, ubicación y cuantificación exacta de las células que proyectan del SpV al núcleo VPM.

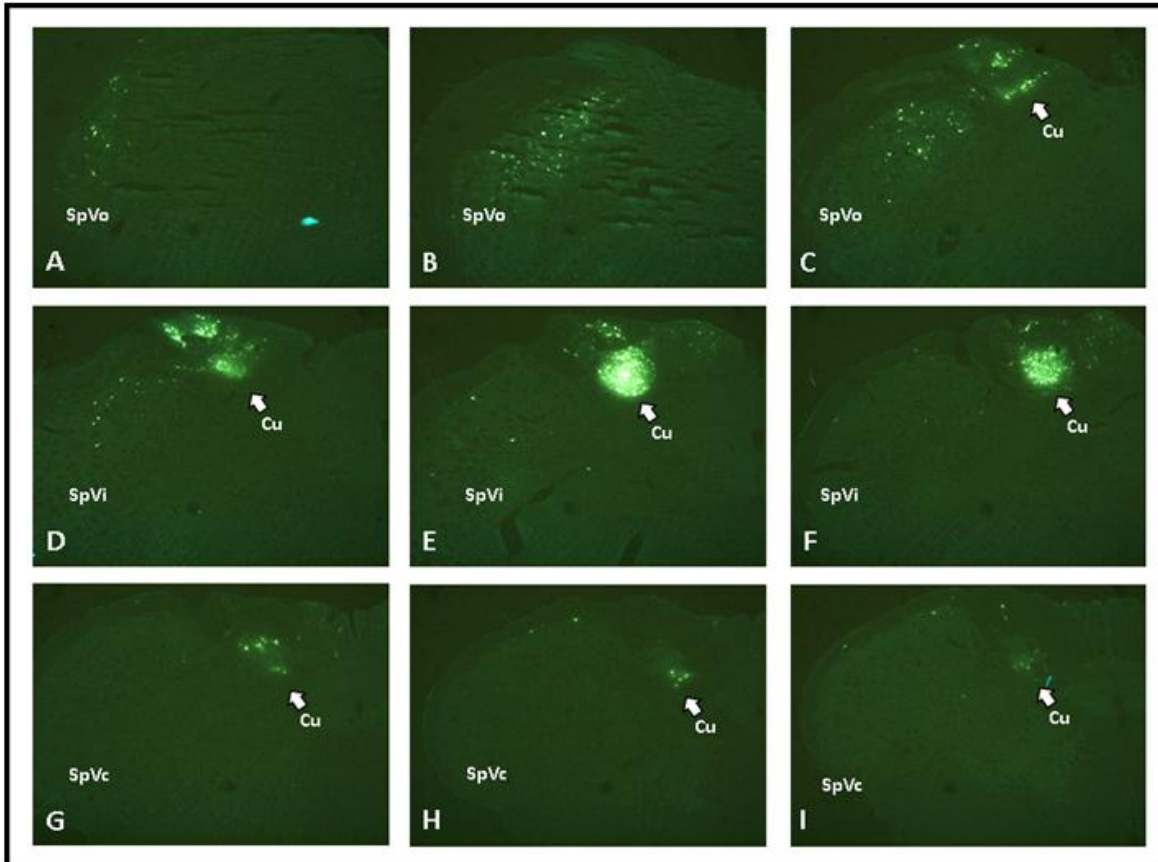


Figura 8. Muestra fotomicrografías de los cortes seriados del núcleo SpV contralateral con respecto al Sitio de inyección de FG en el VPM, los cortes comienzan con la parte anterior del núcleo (A) hasta la parte posterior (I) (-1.52mm a -5.6mm línea interaural). Las células marcadas son las células positivas que envían sus proyecciones al núcleo ventroposteriomedial (VPM). Nótese en la parte superior medial, el núcleo del Cuneatus (Cu), también marcado con el trazador fluorescente FG. Aumento a 25x.

Una vez digitalizados los cortes y las células de interés se traslaparon con esquemas del Atlas de Paxinos y Watson; 1998, para determinar la ubicación exacta de cada célula en cada región de SPV: SpVo, SpVi y SpVc. La distribución celular fue mayor en la porción medial del SPV abarcando la zona SpVi, ver figura 9.

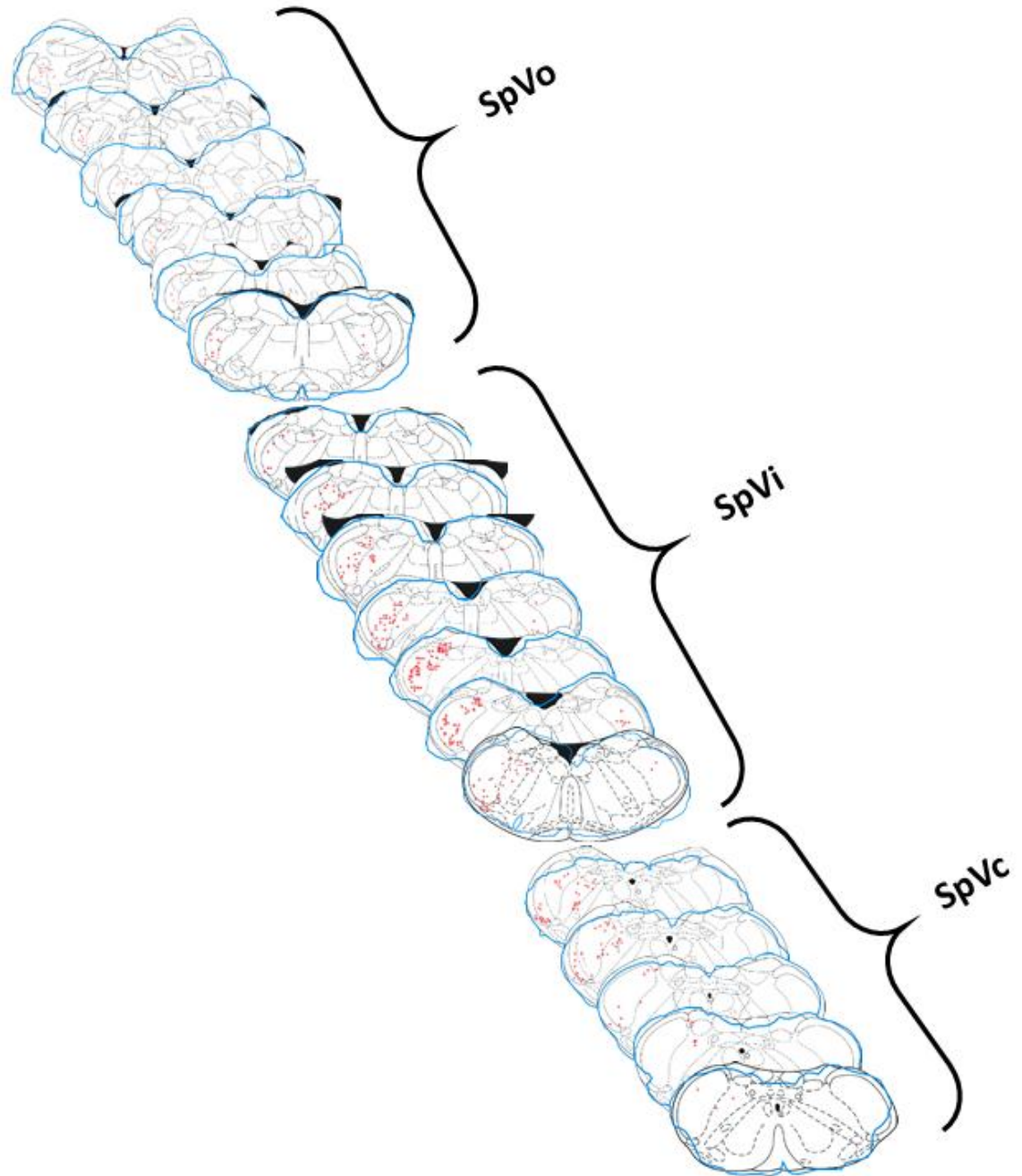


Figura 9. Distribución de las células marcadas con FG (Fluoro Gold) a lo largo del núcleo trigeminal (SpV), abarcando los núcleos Oral (SpVo), Interpolar (SpVi) y Caudal (SpVc); aproximadamente (-1.52mm a -5.6mm línea interaural). Cada punto color rojo en el esquema representa un cuerpo neuronal marcado con FG. Esquemas tomados del Atlas Paxinos and Watson, 1998.

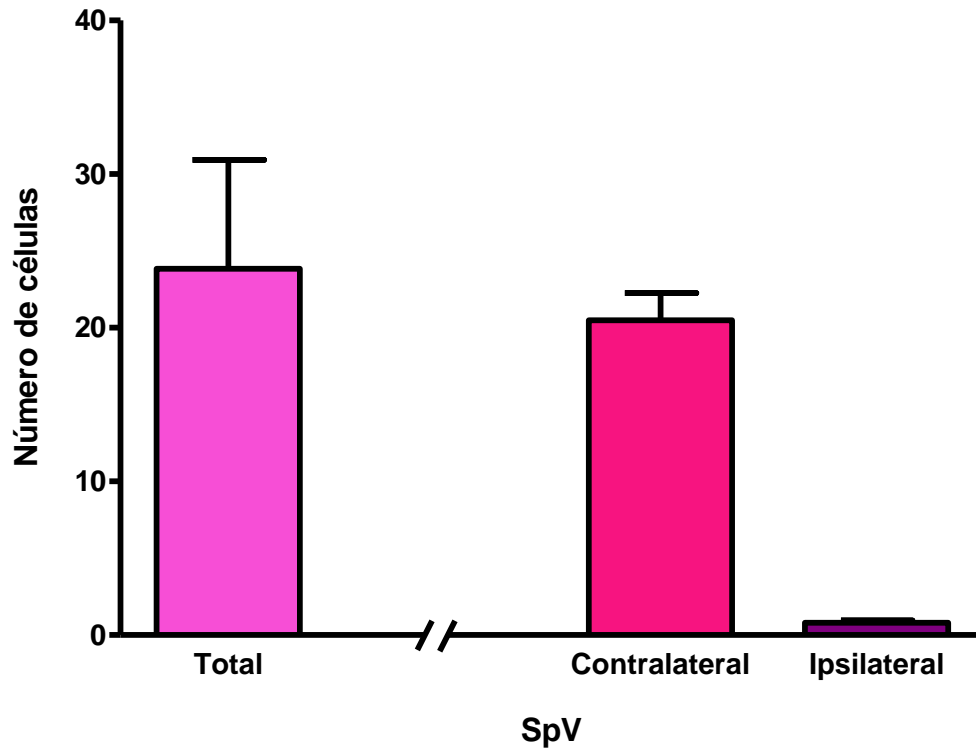
Conteo celular en el complejo SpV

Como ya se mencionó en los cortes digitalizados, se localizaron las células marcadas con FG en el complejo SpV, para con ellas realizar el conteo celular total de la región en las ratas ($n=3$). En la Gráfica 1 se muestra el promedio obtenido del conteo de células en SpV de los 3 animales cuantificados. Donde podemos observar que en promedio en dicha región las células de proyección al VPM fueron de 24 ± 7 células.

Además, al comparar las células encontradas del lado contralateral e ipsilateral de todo el SpV podemos apreciar que las diferencias entre ambos lados son muy grandes siendo del lado contralateral alrededor de 22 ± 2 las células encontradas, mientras que para el ipsilateral 1 ± 2 (Gráfica 2). Por lo que se puede concluir que la vía es predominantemente contralateral; es decir, las células que proyectan del trigémino al núcleo VPM del tálamo son principalmente contralaterales y a continuación únicamente nos referiremos a ellas.

El traslape de los esquemas digitalizados sobre la serie de violeta de cresilo (Figura 10), permitió determinar la cuantificación exacta en las distintas regiones del SpV (SpVo, SpVi y SpVc), tanto del lado contralateral como ipsilateral con respecto al sitio de inyección de FG en el núcleo VPM. Al comparar los conteos realizados por cada región se observó que las regiones SpVo, junto con el SpVi son los núcleos con mayor proyección al VPM, habiendo en promedio 28 ± 6 y 25 ± 2 células positivas a FG en estas regiones respectivamente, mientras que para el SpVc los conteos fueron de 9 ± 2 células (Gráfica 3).

Al realizar el conteo en cada una de las capas (I-V) del núcleo SpV de ambos lados se obtuvo que la mayor cantidad de proyecciones son en las capas I (8 ± 1 células) y II (7 ± 1 células) contralateral, ver gráfica 4 A. También se analizaron las distintas regiones del SpV por capas y se obtuvo lo siguiente: SpVo tiene mayores proyecciones al VPM desde las capas II (11 ± 3 células) y III (9 ± 2 células), el SpVi proyecta desde las capas I (11 ± 1 células) y II (9 ± 1 células), mientras que el SpVc lo hace mayormente desde la capa I (4 ± 1 células) y en las capas II y III con proyecciones de 2 ± 1 células. Considerando solo el lado contralateral, ver gráfica 4 B-D.



Gráfica 1. Representa el Número total de células marcadas con FG (Fluoro Gold) en el complejo SpV . Así como la manera en que estas se distribuyen del lado contralateral como ipsilateral en el complejo SpV, con respecto al sitio de inyección en el VPM (n=3).

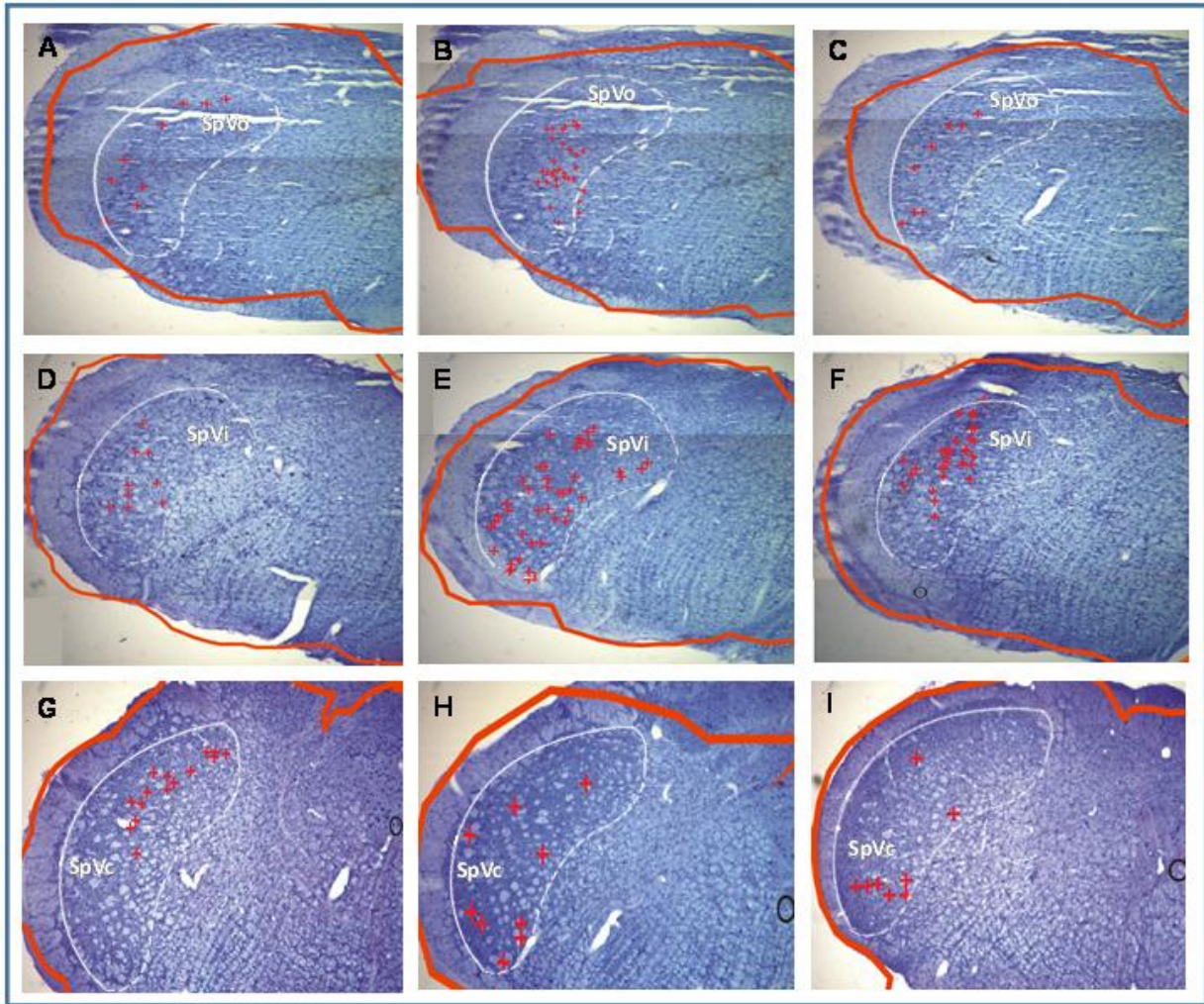
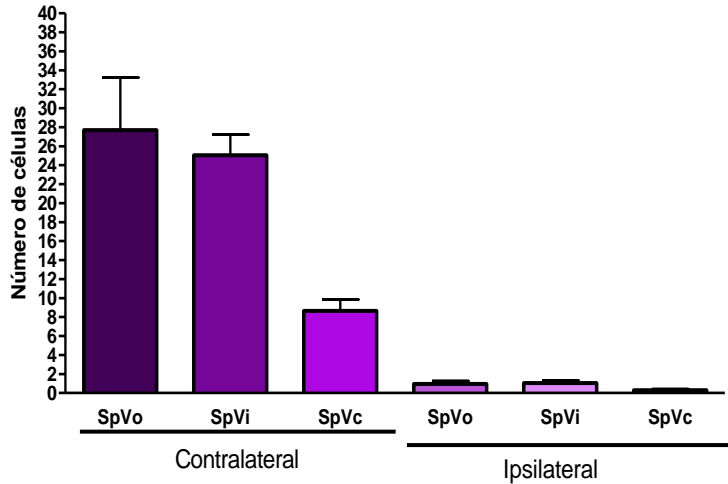
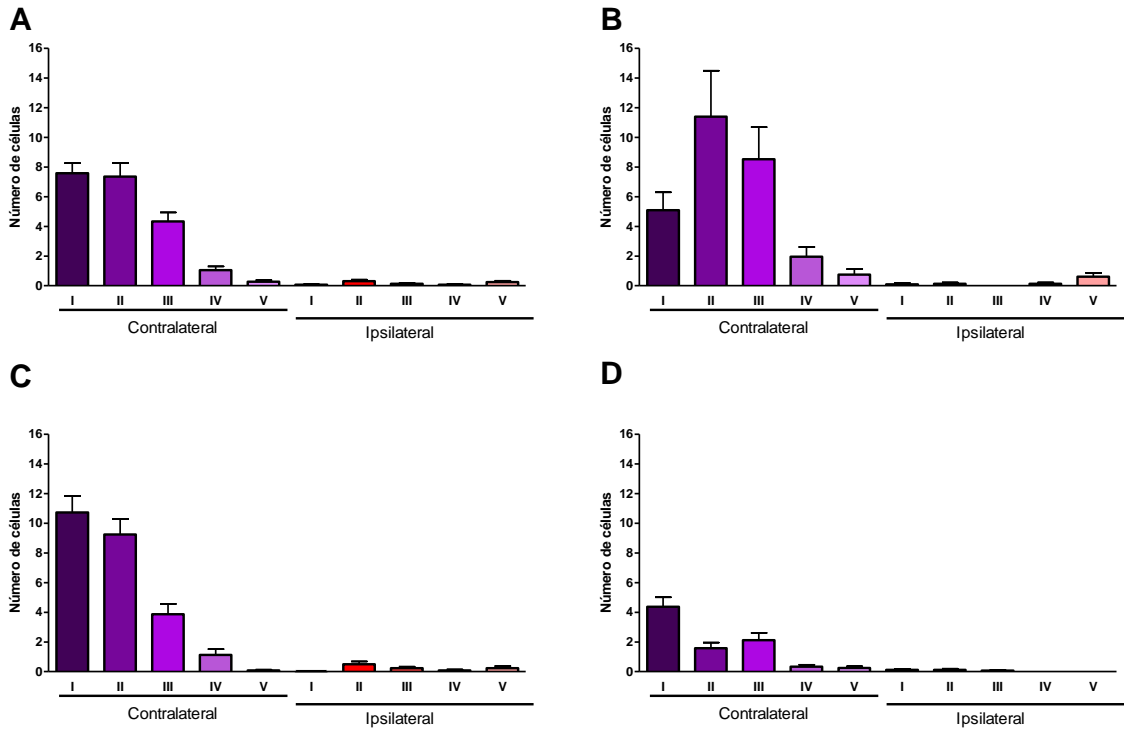


Figura 10. Fotomicrografías de los cortes seriados del núcleo SpV contralateral al VPM inyectado con FG. Los cortes comienzan con la parte anterior del núcleo (A) hasta la parte caudal (I), entre cada corte hay una distancia de 340 μ m (aproximadamente -1.52 a -5.6mm línea interaural). Aumento 25x.



Gráfica 2. Representa el promedio de células marcadas con FG (Fluoro Gold) en los núcleos Oral (SpVo), Interpolar (SpVi) y Caudal (SpVc) del trigémino, tanto del lado contralateral e ipsilateral (n=3). Media \pm error estándar.



Gráfica 3. En A se representa el número total de células en cada una de las capas (I-V) tanto del lado contralateral e ipsilateral de las proyecciones del complejo SpV al VPM. Además de cada una de sus regiones: (B) SpVo, (C) SpVi (C) y SpVc (D). Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar del conteo celular de una n=3.

Proyecciones del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV) al Núcleo Espinal Trigeminal Caudal (SpVc)

Los resultados obtenidos sobre la proyección del NPV al SpV fueron los siguientes: se encontró una mayor proyección de fibras marcadas con FR en la parte ventral del SpVc, así como también fibras cercanas al canal central. En este trabajo nos interesó el SpVc debido a la importancia que tiene este núcleo en la transmisión del dolor. A pesar de que en esta región se encontró un menor número de células marcadas con FG, la proyección del NPV a SPVc se encontró en la región ventral, donde se observaron fibras marcadas con FR. Al realizar el traslape del marcaje de FG/FR no se encontró colocalización, pero si cercanía de las fibras que proyectan del NPV (FR) con células de proyección al VPM, como se muestra en la región ventral de la figura 11.

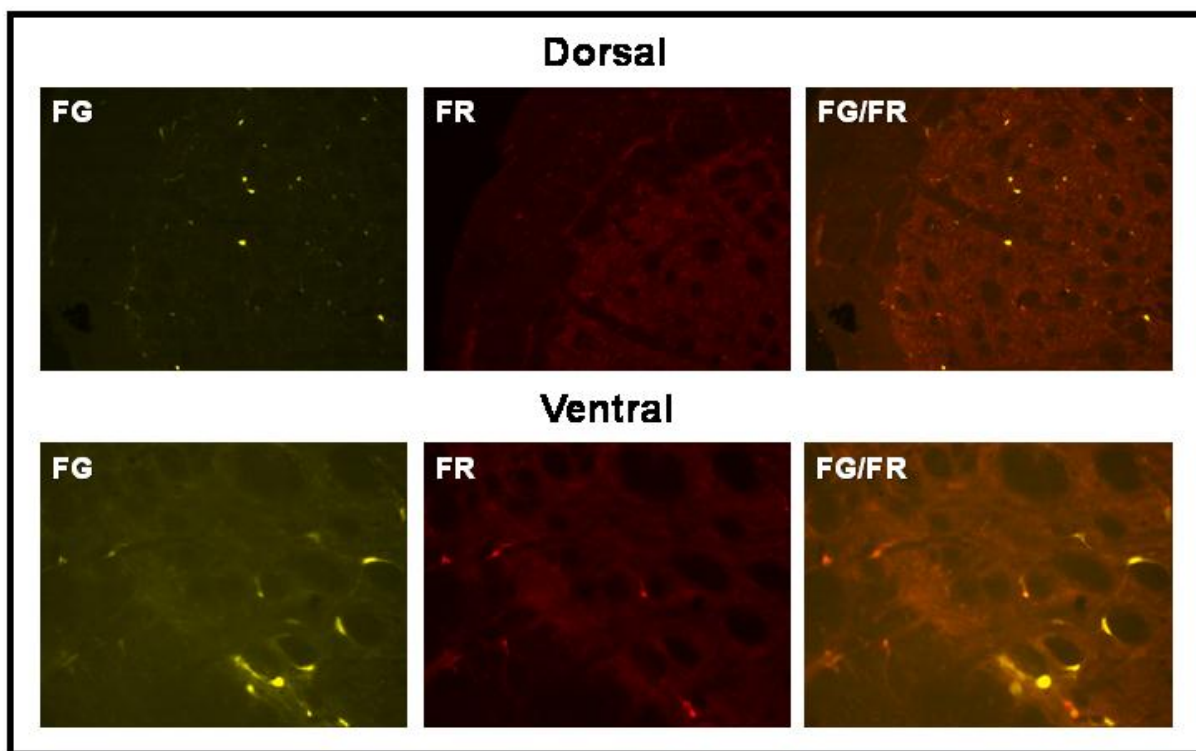


Figura 11. Fotomicrografías mostrando la parte dorsal y ventral. Nótese las células marcadas con Flurogold FG en amarillo y fibras con FluoroRubi (FR) en rojo. Aumento región dorsal 200x y ventral 400x.

Inmunofluorescencia

A continuación se muestran los resultados de las vías descendentes oxitocinérgicas (NPV-SpVc) y los resultados obtenidos del receptor de oxitocina, así como del péptido CGRP.

Vía descendente de oxitocinérgica

Se realizó la inmunofluorescencia a oxitocina en el NPV y se observó que el núcleo se encuentra delimitado por células que contienen a este péptido (Figura 12).

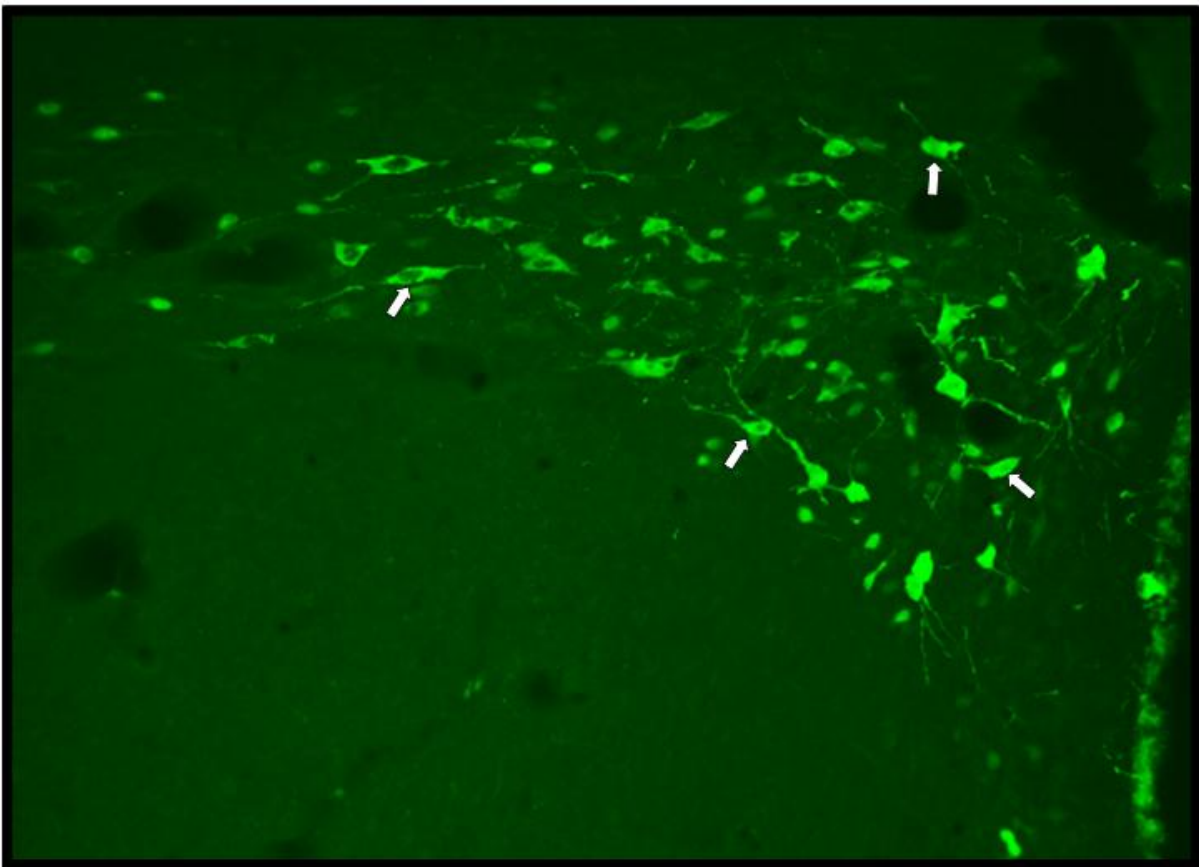


Figura 12. Núcleo paraventricular del hipotálamo, donde se muestran las células oxitocinérgicas. Las flechas blancas señalan algunas de estas células positivas a Oxitocina. Aumento 200x.

CGRP y OT en el SpVc

Región rostro dorsal

Al analizar las fotomicrográficas tomadas en el microscopio confocal en la región SpVc, se observó que el marcaje a CGRP se encontró con mayor densidad en el tracto espinal trigeminal (sp5) y en las capas más superficiales de SpVc, mientras que para oxitocina se encontró en las capas I, II y III, siendo más abundante en estas dos últimas. Finalmente las células de proyección al VPM marcadas con FG fueron escasamente observadas en las capas más superficiales del tejido, es importante recalcar que aunque las células se encontraban cercanas, no presentaron colocalización entre ellas y solo cercanías con fibras OT (Figura 13).

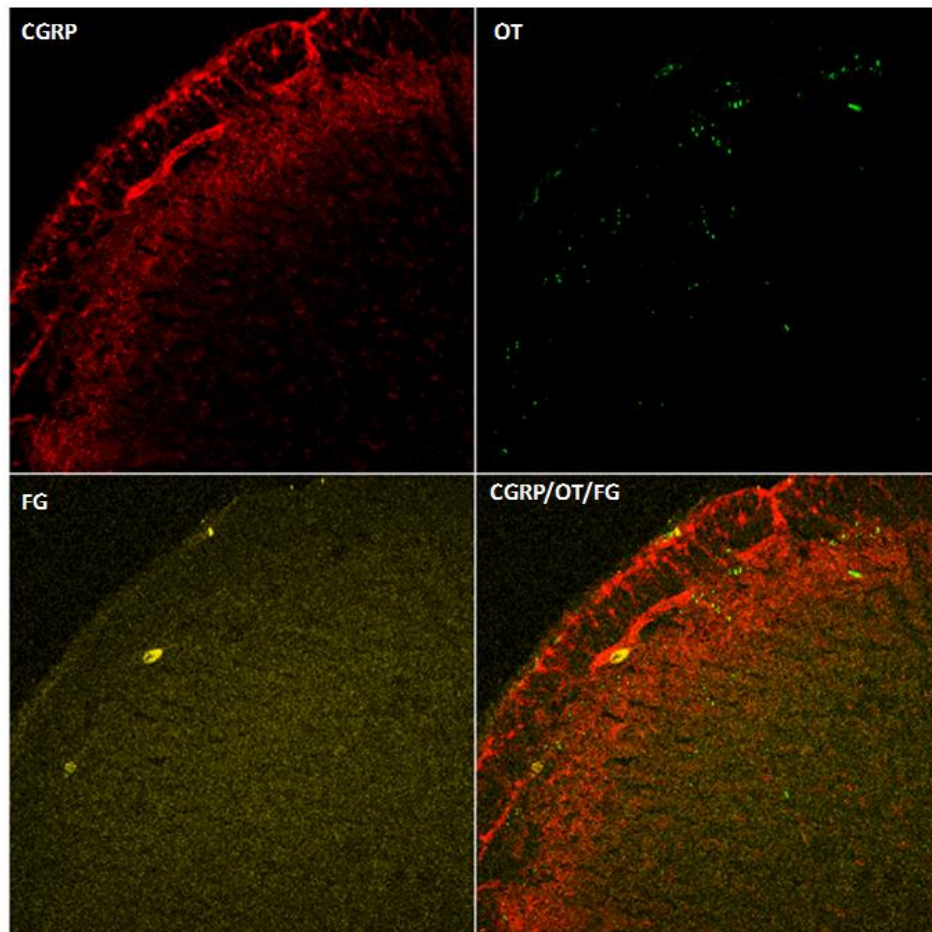


Figura 13. Fotomicrográficas en proyección Z tomadas en microscopio Confocal de la región rostro dorsal de SpVc. Muestra los distintos canales de inmunofluorescencia a: Péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) en rojo, oxitocina (OT) en verde, en amarillo el trazador neuronal Fluoro Gold (FG) y por último un traslape de los 3 canales (CGRP/OT/FG). Aumento 250x.

Región caudal dorsal

Las diferentes pruebas de inmunofluorescencia a oxitocina (OT) y su receptor (OT-R), se muestran en las siguientes fotomicrográficas obtenidas del microscopio confocal, en ellas se analizó la región caudal dorsal del SpVc; donde se observaron pocas fibras positivas a FR en las capas II y III, OT en la capa III, y células de proyección al VPM con FG en las capas I y II al igual que el receptor OT-R, ambas presentan colocalización en algunas células (Figura 14).

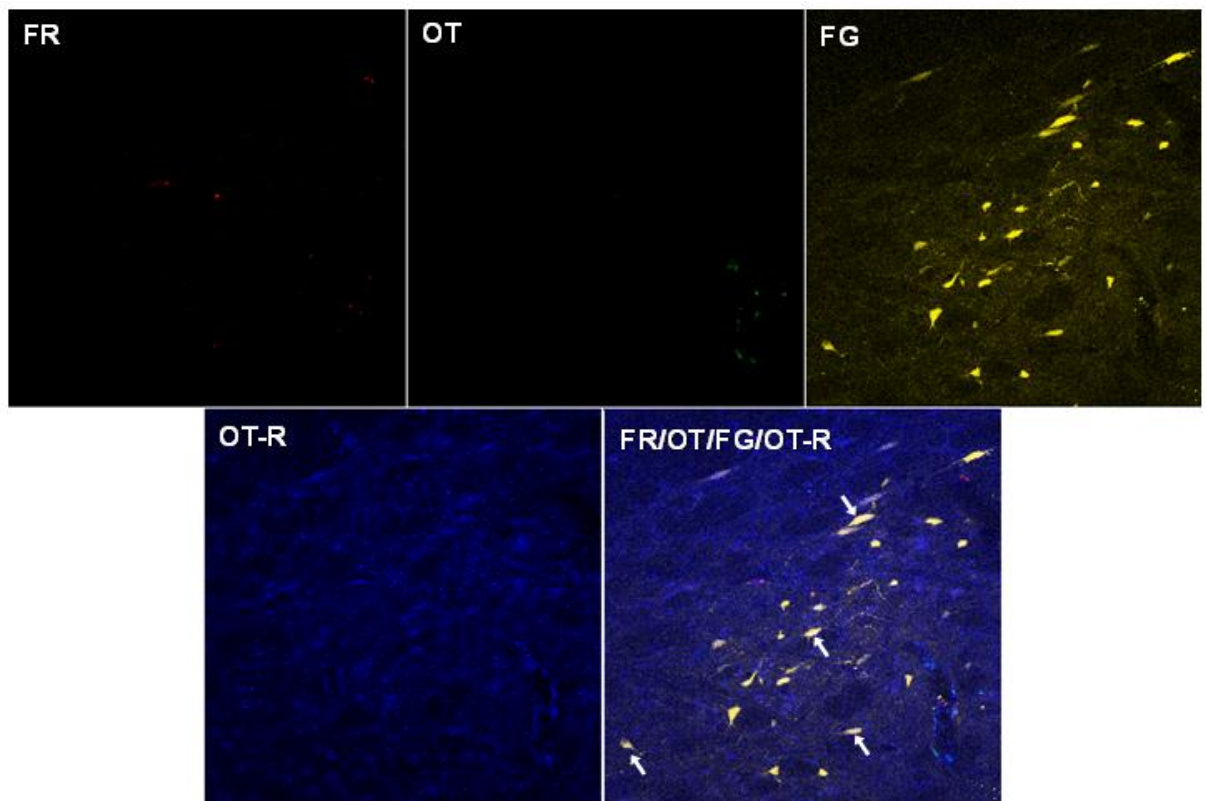


Figura 14. Fotomicrográficas en proyección Z tomadas en microscopio Confocal de la región caudal dorsal de SpVc. Muestra los distintos canales de inmunofluorescencia a: el trazador Fluro Rubí (FR) en rojo, oxitocina (OT) en verde, en amarillo el trazador neuronal Fluro Gold (FG), en azul el receptor a oxitocina (OT-R) y por último un traslape de los 4 canales (FR/OT/FG/OT-R) Donde se puede ver las células con marcaje FG y que presentan el OT-R señaladas con las flechas blancas. Aumento 250x.

Discusión

El análisis de los sitios de inyección de ambos trazadores FR y FG permitió observar que éstos fueron inyectados en estructuras que están involucradas en el circuito del procesamiento del dolor, las cuales están encargadas de la integración y modulación de la información sensorial, ya que son sitios de relevo de los estímulos que llegan a la corteza y que provienen de diferentes áreas (Millan, 1999). De esta forma se identificaron las proyecciones descendentes del NPV al SpV y ascendentes del SpV al VPM.

Por otro lado, se sabe que las vías ascendentes trazadas del SpV al VPM son principalmente contralaterales (Nosedá et al., 2008), aunque cabe señalar que en nuestros conteos también se obtuvo marcaje ipsilateral, esto indica que la vía es bilateral y preferencialmente contralateral.

Hasta el momento no hay reportes que indiquen el número de células totales que proyectan desde el complejo trigeminal al VPM, por lo que el valor de 24 ± 7 células, podría ser altamente representativo para toda la región, ya sean contralaterales (22 ± 2 células) o ipsilaterales (1 ± 2 células). Por otra parte, aunque los valores por áreas (SpVo, SpVi y SpVc) sean diferentes a los reportados previamente, 86 ± 62 células para el SpVo y 89 ± 34 células para el SpVc provenientes del VPM (Guy et al., 2005), nuestros resultados corresponden a menos de la mitad de éstas, debido a que fueron contabilizadas un total de 28 ± 6 células en la región del SpVo, mientras que en el SpVc nuestros conteos (9 ± 2 células) corresponderían a menos del 10% de las correspondientes a ese estudio. Este hallazgo puede deberse a que la localización de las células marcadas retrógradamente está altamente relacionada con la localización del sitio de inyección en el VPM y la realización la misma.

En este estudio se pudo observar como el trazador por difusión alcanzó más subnúcleos del tálamo como el VPL, Po, así como, ligeramente el núcleo talámico reticular, por lo que el marcaje proveniente originado del Po podría estar causando la proyección contralateral. Existen varios resultados contradictorios sobre esto en la literatura, por ejemplo: en un estudio anterior, el marcaje contralateral encontrado incluía otros núcleos del tálamo como el tálamo triangular posterior, el Po y VPM (lateral y dorsal) (Guy et al., 2005; Nosedá et al., 2008), por lo que aunque nuestro

trazador si tocó el Po, así como el VPL, no tuvo contacto con el tálamo triangular posterior, lo cual podría explicar la diferencia en los conteos celulares.

Otro resultado interesante fue el conteo celular obtenido en SpVi, ya que de las 25 ± 2 células que se encontraron, la literatura indica que de este núcleo el 75% de sus proyecciones son al VPM, el 17.4% al Po y el otro 7.4% hacia ambos núcleos talámicos; mientras que el 90% de las proyecciones del PrV van a VPM, un 7% proyectan al Po y sólo el 1.4% restante proyecta a ambos, lo que sugiere que las proyecciones de ambos sistemas son en gran medida independientes (Chiaia et al., 1991). Aunado a esto, se sabe que la mayoría de proyecciones al VPM provienen del PrV y del SpVi, pero no representan neuronas nociceptivas, sino principalmente son de proyección de las vibras en la mayoría de roedores y de animales carnívoros (Groenewegen and Witter, 2015).

El conocer no sólo la distribución de las células en las proyecciones, sino también el ubicar en cual capa se encuentra cada una, representa una gran evidencia que puede ser utilizada para establecer con mejor precisión cómo puede llevarse a cabo la vía ascendente.

Para la región SpVo los resultados reportados por Guy et al., en 2005 no reflejan los obtenidos en este estudio, ya que para ellos la mayoría de sus células se localizaron en la capa I (60%), otro 20% en las capas III y IV y el 20% restante en la capa V y prácticamente no encontraron células en la capa II, para nosotros la capa que presentó la mayor distribución celular fue precisamente la II (41%), seguida por las capas III y I que reflejan un porcentaje de 31% y 18% respectivamente, seguidas por la capa IV que representa alrededor del 7% de las células y finalmente la capa V que tiene menos del 3% de marcaje.

Las células del SpVc se distribuyen principalmente en la capa I, la mitad en la capa V, un cuarto en las láminas III y IV y el marcaje en la capa II fue inexistente (Guy et al., 2005), esto es importante para establecer la vía ascendente del trigémino, debido a que está relacionada con las fibras α , β y A δ y a la transmisión de la señal dolorosa, ya que este núcleo está altamente implicado en la transmisión de impulsos nociceptivos a centros superiores, por lo que nuestra distribución, aunque es similar a la mencionada en las Capas I, III y IV, en las capas II y V representó un quinto de las células, sólo que a diferencia del trabajo anterior en la capa V nuestro marcaje sólo corresponde a un 3% de las células totales.

Como parte de las vías ascendentes de dolor trazadas desde SpVc al VPM su variación puede ser explicada en nuestros resultados teniendo en cuenta que a pesar de que las regiones lateral y medial del SpVc proyectan hacia áreas comunes del tálamo, cualitativamente la densidad de las proyecciones es distinta, ya que el VPM lateral recibe aferentes de la parte ventral (oftálmica) del SpVc, mientras que la parte intermedia y medial la reciben de la rama maxilar y finalmente la dorsal proviene de la rama mandibular de SpVc (Nosedá et al., 2008), lo cual explica la densidad diferente entre las capas de SpVc en nuestros conteos.

La información térmica y nociceptiva proveniente de la cara que llega a las láminas I, II y V viajan por una vía separada hasta el tálamo (Pazo, 2000; Mas and Blanch, 2007). Los axones de primer orden que se originan en las células de los ganglios trigeminales llevan información desde los termorreceptores y nociceptores hasta el sistema nervioso central, a través de fibras descendentes que forman el tracto trigeminal hasta el bulbo, donde las neuronas de segundo orden, que tras cruzar la línea media, ascienden por el lemnisco trigeminal hasta el tálamo contralateral, llegan específicamente al VPM y a los núcleos posteriores (Po). Desde el tálamo, las neuronas de tercer orden llevan la información hasta la corteza somatosensorial, que junto con las interconexiones con la amígdala, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal, sugieren una implicación en los aspectos emocionales, psicomotores y en las respuestas autónomas al dolor (Li et al., 1997; Caous et al., 2001; Gauriau and Bernard, 2002; Monconduit et al., 2002).

Por su parte, el núcleo VPM presenta tipos celulares y una organización similar al núcleo VPL, estando involucrado de manera similar en los aspectos sensoriales (Willis Jr. et al., 2001) y discriminativos de información térmica, mecánica y táctil (Brown et al., 1989; Li et al., 1997; Willis Jr. et al., 2001). Sin embargo, su contribución a la experiencia dolorosa está bien diferenciada. Esto debido a que recibe proyecciones de las fibras procedentes de la región parabraquial y del núcleo trigeminal, estando el VPM encargado de recibir los impulsos de la cara, mientras que el VPL se encarga de procesar los que provienen del resto del cuerpo (Bottini and Gandola, 2008).

Aunque no se realizaron los conteos sobre el PrV, se observó que este también contenía una gran cantidad de células marcadas, lo cual sugeriría que el procesamiento del sistema trigeminal de la rata relacionado con las vibras estaría

compuesto por dos vías, una surgiendo del PrV caracterizada por campos receptivos pequeños que es capaz de transmitir información al tálamo dorsal y una segunda proveniente del SpVi caracterizado por campos receptivos amplios y que es capaz de transmitir una gran cantidad de información acerca de los receptores de la superficie (Chiaia et al., 1991).

Debido a que la funcionalidad de las conexiones intratrigeminales no es clara, se cree que las entradas ipsilaterales de las neuronas trigeminovasculares a los núcleos más rostrales del trigémino, podrían contribuir a la amplificación de las respuestas ante impulsos nociceptivos hacia estructuras supramedulares, a través de las divisiones oral y principal, debido a que estas regiones proveen impulsos hacia el tallo cerebral y las áreas talámicas, donde se ha demostrado que el tipo de neuronas que predominan en el VPM son las denominadas neuronas de amplio rango dinámico (WDR), las cuales pueden reaccionar a una gran cantidad de estímulos, ya sean inócuos o nocivos. Las proyecciones de este núcleo a la corteza SII sugieren diferentes formas de procesamiento a los estímulos dolorosos (Noble and Short, 1989; Apkarian and Shi, 1994; Millan, 1999; Treede et al., 1999; Meng and Lu, 2000). Mientras que las proyecciones contralaterales podrían proveer entradas desde la división oftálmica del nervio trigeminal que específicamente podrían modular la actividad de las células medulares y del asta dorsal de la médula espinal. Estas entradas podrían ser efectivas al seguir la estimulación dolorosa continua de nociceptores en las meninges y con esto contribuir a la sensibilización que ocurre después de los ataques de migraña (Nosedá et al., 2008).

El VPM sería el centro superior encargado de procesar los estímulos provenientes del SpVc, ya que este último está implicado en la transmisión del dolor debido a que recibe aferencias en sus capas I y II de fibras A δ y C que son las implicadas en la transmisión de impulsos dolorosos y en respuesta a esta señal nociceptiva recibir una regulación descendente de analgesia proveniente del NPV a través de la oxitocina.

Como es sabido, el NPV envía sus proyecciones a diferentes áreas dentro del cerebro y de la médula espinal (Eliava et al., 2016). Estas proyecciones del NPV se acoplan con el núcleo de Rafé, promoviendo efectos inhibitorios en las sensaciones dolorosas (Condés-Lara et al., 2012), formando parte de la vía descendente inhibitoria.

Para establecer la relación que existe en la vía a través de los sitios de inyección y su extensión en el NPV al igual que en el VPM, es importante comparar nuestros resultados con estudios previos donde las vías provenientes del NPV hacia el SpV pueden presentar diferentes resultados dependiendo de la región del SpVc que fue inyectada (Abdallah et al., 2013)(Nosedá et al., 2008; Koltzenburg et al., 2013). Los hallazgos aquí plasmados son similares a algunos de los de la literatura, esto podría deberse en parte a la variedad de latencia, a los sitios de inyección, a la magnitud de los efectos de las vías del NPV al SpVc, a la variabilidad, a que el volumen usado no fue el mismo o a la difusión particular que presenta cada sustancia (Robert et al., 2013).

De acuerdo a un estudio realizado, la vía trazada y el núcleo de destino dentro del NPV era distinto a pesar de que todas las inyecciones se realizaron en el SpVc, siendo las áreas parvicelulares medial y dorsal, así como el área posterior magnocelular del NPV, las que presentaban mayor número de células marcadas, provenientes de dicha región (Koltzenburg et al., 2013), mientras que en nuestros resultados la inyección en el NPV no fue exactamente en esos sitios, sino que dentro del NPV se tocaron las áreas ventral, medial parvicelular, la capa dorsal, lateral magnocelular, así como también el núcleo paraxifoide del tálamo, por lo que la densidad de fibras provenientes del NPV, puede ser explicada debido a que no se tocó el área medial parvicelular ni la posterior magnocelular, de donde según los resultados previos proviene el mayor número de proyecciones (Abdallah et al., 2013) .

En nuestros resultados en la región ventral de SPVc, se encontraron fibras marcadas con FR, provenientes del NPV, mientras que el péptido oxitocina era más abundante en las capas II y III, lo que nos orilla a pensar que actúa sobre regiones que estarían mediando la analgesia endógena para disminuir la respuesta nociceptiva, ya que presentaba una distribución similar, al menos en el caso de oxitocina, con CGRP tanto en la médula espinal así como en el SpVc, esto puede deberse a que estos núcleos comparten una distribución similar, siendo las láminas I, II y III las cuales reciben una mayor cantidad de aferentes de fibras nociceptivas (Unger and Lange, 1991). Esto concuerda parcialmente con nuestros resultados, donde CGRP fue encontrada principalmente en el tracto trigeminal y capas superficiales, mientras que aunque si había oxitocina en la capa I, era en las capas II y III del SpV donde era más abundante.

Sabemos que las respuestas nociceptivas del SpVc ocurren principalmente en las láminas I, II y V (Waite, 2015), por lo que relacionando estas vías descendentes con nuestro nonapéptido de interés, la oxitocina, podría esperarse que los receptores de oxitocina estuvieran presentes dentro de estas regiones del SpVc como una medida endógena de analgesia, esto debido a que estos receptores oxitocinérgicos a nivel de la red neural se encuentran acoplados a proteínas de tipo $G_{i/o}$ (Eliava et al., 2016) las cuales de manera general se caracterizan por promover la hiperpolarización de la membrana, evitando con esto el envío de la señal dolorosa promoviendo un efecto analgésico, cuando son activados. Por lo cual, el acoplamiento de circuitos inhibitorios GABAérgicos mediado en las capas superficiales en el asta dorsal de la médula espinal, que expresan receptores de oxitocina (Jo et al., 1998) podrían actuar junto con las proyecciones directas de las neuronas de sintetizadoras de oxitocina del hipotálamo (Swanson and McKellar, 1979; Sofroniew et al., 1981), para reducir la señalización aferente y nociceptiva de las fibras A δ y C (Robinson et al., 2002; Condés-Lara et al., 2006, 2008, 2009, Rojas-Piloni et al., 2007, 2008; Breton et al., 2008; Juif and Poisbeau, 2013; Gong et al., 2015).

Es por esto que podría esperarse que los receptores de oxitocina estuvieran presentes dentro de estas regiones del SpVc, lo cual ocurrió en nuestro estudio, donde se encontró la presencia del receptor de oxitocina en las capas más superficiales I y II, lo cual nos indicaría la existencia de medida endógena de analgesia mediada por este neuropéptido.

Esto se comprobó por medio de inmunohistofluorescencia, debido a que gracias a esta técnica encontramos la presencia, no sólo de oxitocina, sino también de su receptor tanto en las regiones superficiales anteriores, como también en las más caudales de SpVc, aunque estas no presentaron colocalización en SpV, si se encontró colocalizaron de las células que presentaban el receptor de oxitocina con las células que proyectan al VPM, por lo que el sistema de modulación de analgesia endógena puede ser descartado.

Al haber obtenido estos resultados en ratas, es importante tener en cuenta que un mismo neuropéptido puede tener efectos distintos sobre las poblaciones neuronales, por lo cual, si se quieren extrapolar los resultados obtenidos hacia otras especies, no debemos olvidar que en distintos modelos animales, (como conejillos de indias, monos o humanos) los resultados han sido distintos en cuanto a la distribución

de oxitocina y de su receptor (Loup et al., 1989).

Los resultados mostrados presentan evidencia que sustenta la vía desde el NPV al SpV y de SpV al VPM y aunque se comprobó que en ésta, están presentes los receptores de oxitocina; así como el neuropéptido, sería importante determinar si la presencia de ésta puede ser alterada y cómo esto podría repercutir en la actividad del nervio trigémino, es decir, si esto podría estar conllevando un sistema de analgesia endógena que modulara los impulsos nociceptivos del SpV, para establecer en un futuro una relación anatómica-funcional que estuviera mediando este mecanismo endógeno de analgesia.

Conclusión

Las células que proyectan desde la región dorsal del SpVc hacia el VPM presentaron el receptor a oxitocina, por lo cual probablemente participen en el sistema de analgesia endógena.

Las fibras que proyectan desde el NPV hacia la región dorsal de SpVc, se localizaron muy cerca de las células de proyección al VPM, sin embargo no colocalizaron con oxitocina, además otras fibras oxitocinérgicas se encontraron también cerca de estos cuerpos neuronales que proyectan a VPM.

Bibliografía

- Ab Aziz CB, Ahmad AH (2006) The role of the thalamus in modulating pain. *Malays J Med Sci MJMS* 13:11–18.
- Abdallah K, Artola A, Monconduit L, Dallel R, Luccarini P (2013) Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus caudalis in rats. *PLoS One* 8:e73022.
- Apkarian AV, Shi T (1994) Squirrel monkey lateral thalamus. I. Somatic nociceptive neurons and their relation to spinothalamic terminals. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14:6779–6795.
- Baribeau DA, Anagnostou E (2015) Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits. *Front Neurosci* 9:335.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2007) *Neuroscience*, 3rd ed. pp 206. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
- Biag J, Huang Y, Gou L, Hintiryan H, Askarinam A, Hahn JD, Toga AW, Dong H-W (2012) Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *J Comp Neurol* 520:6–33.
- Bottini G, Gandola M (2008) Somaesthetic recognition disorders. In: *Neuropsychological Research: A Review*, 1st ed., pp 285–303. New York: Psychology Press.
- Breton J-D, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P (2008) Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain* 4:19.
- Brown AG, Maxwell DJ, Short AD (1989) Receptive fields and in-field afferent inhibition of neurones in the cat's lateral cervical nucleus. *J Physiol* 413:119–137.
- Busnelli M, Saulière A, Manning M, Bouvier M, Galés C, Chini B (2012) Functional Selective Oxytocin-derived Agonists Discriminate between Individual G Protein Family Subtypes. *J Biol Chem* 287:3617–3629.
- Caous CA, de Sousa Buck H, Lindsey CJ (2001) Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory

- functions. *Auton Neurosci Basic Clin* 94:14–24.
- Chiaia NL, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Fish SE, Killackey HP (1991) Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei. *J Comp Neurol* 314:201–216.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López Hidalgo M, Freund-Mercier MJ (2006) Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res* 1081:126–137.
- Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rojas-Piloni G, Rodríguez-Jiménez J (2007) Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Res* 1160:20–29.
- Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, Rojas-Piloni G (2008) Paraventricular hypothalamic nucleus stimulation modulates nociceptive responses in dorsal horn wide dynamic range neurons. *Neurosci Lett* 444:199–202.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J (2009) Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *Eur J Neurosci* 30:1056–1063.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Diez-Martínez DC, Rodríguez-Jiménez J (2012) Functional interactions between the paraventricular hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *Neuroscience* 209:196–207.
- Crankshaw DJ, Branda LA, Matlib MA, Daniel EE (1978) Localization of the oxytocin receptor in the plasma membrane of rat myometrium. *Eur J Biochem FEBS* 86:481–486.
- Eliava M et al. (2016) A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* 89: 1–14.
- Falaki F, Nejat AH, Dalirsani Z (2014) The Effect of Low-level Laser Therapy on Trigeminal Neuralgia: A Review of Literature. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 8:1–5.
- FitzGerald MJT, Gruener G, Mtui E (2012) Hypothalamus. In: *Clinical neuroanatomy*

- and neuroscience. pp 277–283. Edinburgh: Saunders/Elsevier..
- Fuchs AR, Periyasamy S, Alexandrova M, Soloff MS (1983) Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. *Endocrinology* 113:742–749.
- Furuya K, Mizumoto Y, Makimura N, Mitsui C, Murakami M, Tokuoka S, Ishikawa N, Nagata I, Kimura T, Ivell R (1995) A novel biological aspect of ovarian oxytocin: gene expression of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus/luteal cells and the effect of oxytocin on embryogenesis in fertilized oocytes. *Adv Exp Med Biol* 395:523–528.
- Gauriau C, Bernard J-F (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87:251–258.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629–683.
- Gong L, Gao F, Li J, Li J, Yu X, Ma X, Zheng W, Cui S, Liu K, Zhang M, Kunze W, Liu CY (2015) Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca(2+)/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience* 289:417–428.
- Gouin J-P, Carter CS, Pournajafi-Nazarloo H, Glaser R, Malarkey WB, Loving TJ, Stowell J, Kiecolt-Glaser JK (2010) Marital behavior, oxytocin, vasopressin, and wound healing. *Psychoneuroendocrinology* 35:1082–1090.
- Groenewegen H, Witter M (2015) Thalamus. In: *The rat nervous system*, Fourth edition., pp 407–453. Amsterdam: Elsevier AP.
- Guy N, Chalus M, Dallel R, Voisin DL (2005) Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur J Neurosci* 21:741–754.
- Hernández MGG, Rodríguez JPS, Villegas ST (2012) Neuralgia del trigémino. 1:39–47.
- Holle D, Katsarava Z, Obermann M (2010) The Hypothalamus: Specific or Nonspecific Role in the Pathophysiology of Trigeminal Autonomic Cephalalgias? *Curr Pain Headache Rep* 15:101–107.
- Horn J, Swanson L (2013) The Autonomic Motor System and the Hypothalamus. In: *Principles of Neural Science*, 5th ed., pp 1056–1078. NewYork, NY: McGraw Hill Professional.

- Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, Paquin J, McCann SM, Gutkowska J (2004) Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13074–13079.
- Jo YH, Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ, Schlichter R (1998) Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18:2377–2386.
- Johnston JM, Amico JA (1986) A prospective longitudinal study of the release of oxytocin and prolactin in response to infant suckling in long term lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 62:653–657.
- Juif P-E, Poisbeau P (2013) Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain* 154:1449–1456.
- Kessinger R, Matthews A (2012) Resolution of trigeminal neuralgia in a 14 year old following upper cervical chiropractic care to reduce vertebral subluxation: A case study [case report]. *Up Cerv Chiropr Res* 3:77–84.
- Kharazia VN, Weinberg RJ (1994) Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14:6021–6032.
- Kiss JZ, Martos J, Palkovits M (1991) Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *J Comp Neurol* 313:563–573.
- Koltzenburg M, McMahon SB, Tracey I, Turk DC (2013) Wall & Melzack's Textbook of Pain, Expert Consult - Online and Print, 6: Wall & Melzack's Textbook of Pain. pp 952–960. Elsevier Health Sciences.
- Li JL, Kaneko T, Nomura S, Li YQ, Mizuno N (1997) Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 384:127–141.
- Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Pizzolato G, Dreifuss JJ (1989) Localization of oxytocin binding sites in the human brainstem and upper spinal cord: an autoradiographic study. *Brain Res* 500:223–230.
- Lu SM, Lin RC (1993) Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res* 10:1–16.
- Mas CS, Blanch GG (2007) *Fundamentos de neurociencia*, 1st ed. pp 149–180. Barcelona: Editorial UOC.

- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62:551–577.
- McNeilly AS, Robinson IC, Houston MJ, Howie PW (1983) Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. *Br Med J Clin Res Ed* 286:257–259.
- Meng Z, Lu G (2000) Projection linkage from spinal neurons to both lateral cervical nucleus and solitary tract nucleus in the cat. *Biol Signals Recept* 9:38–44.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164.
- Monconduit L, Bourgeois L, Bernard J-F, Villanueva L (2002) Systemic morphine selectively depresses a thalamic link of widespread nociceptive inputs in the rat. *Eur J Pain Lond Engl* 6:81–87.
- Netter FH (2010) *Atlas of Human Anatomy, Fifth Edition*. pp 109–110. Philadelphia PA: Elsevier Health Sciences.
- Noble R, Short AD (1989) Spatial spread of in-field afferent inhibition in the cat's spinocervical tract. *J Physiol* 413:107–118.
- Nosedá R, Monconduit L, Constandil L, Chalus M, Villanueva L (2008) Central nervous system networks involved in the processing of meningeal and cutaneous inputs from the ophthalmic branch of the trigeminal nerve in the rat. *Cephalalgia Int J Headache* 28:813–824.
- Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J (2002) Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9550–9555.
- Paxinos G (2014) *The Rat Nervous System*. Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates, 6 th*. Amsterdam; Boston: Elsevier.
- Pazo J (2000) Fisiología del sistema somatosensorial. In: *Fisiología humana de Houssay/Physiology of Houssay, 7th ed.*, pp 816–847. Buenos Aires: El Ateneo.
- Pettibone DJ, Guidotti M, Harrell CM, Jasper JR, Lis EV, O'Brien JA, Reiss DR, Woyden CJ, Bock MG, Evans BE (1995) Progress in the development of oxytocin antagonists for use in preterm labor. *Adv Exp Med Biol* 395:601–612.
- Reiter MK, Kremarik P, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME, Desaulles E, Feltz P (1994)

- Localization of oxytocin binding sites in the thoracic and upper lumbar spinal cord of the adult and postnatal rat: a histoautoradiographic study. *Eur J Neurosci* 6:98–104.
- Riley PR, Flint AP, Abayasekara DR, Stewart HJ (1995) Structure and expression of an ovine endometrial oxytocin receptor cDNA. *J Mol Endocrinol* 15:195–202.
- Robert C, Bourgeois L, Arreto C-D, Condes-Lara M, Nosedá R, Jay T, Villanueva L (2013) Paraventricular hypothalamic regulation of trigeminovascular mechanisms involved in headaches. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:8827–8840.
- Roberts JS, McCracken JA, Gavagan JE, Soloff MS (1976) Oxytocin-stimulated release of prostaglandin F₂α from ovine endometrium in vitro: correlation with estrous cycle and oxytocin-receptor binding. *Endocrinology* 99:1107–1114.
- Robinson DA, Wei F, Wang GD, Li P, Kim SJ, Vogt SK, Muglia LJ, Zhuo M (2002) Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol* 540:593–606.
- Rojas-Piloni G, López-Hidalgo M, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, Condés-Lara M (2007) GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Res* 1137:69–77.
- Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, DelaTorre S, Condés-Lara M (2008) Nociceptive spinothalamic tract and postsynaptic dorsal column neurons are modulated by paraventricular hypothalamic activation. *Eur J Neurosci* 28:546–558.
- Ruis H, Rolland R, Doesburg W, Broeders G, Corbey R (1981) Oxytocin enhances onset of lactation among mothers delivering prematurely. *Br Med J Clin Res Ed*:340–342.
- Sherman SM, Guillery RW (2006) Exploring the Thalamus and its role in Cortical Function. In: *Exploring the Thalamus and its Role in Cortical Function*, pp 1–28. Massachusetts: Cambridge, MIT Press.
- Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R (1981) Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. *Acta Histochem Suppl* 24:79–95.

- Swanson LW, Kuypers HG (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194:555–570.
- Swanson LW, McKellar S (1979) The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 188:87–106.
- Swenson R (2006) Chapter 7: Trigeminal System and Trigeminal Sensory. In: *Review of Clinical and Functional Neuroscience*. Available at: <https://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/index.html> [Accessed April 13, 2016].
- Tracy LM, Georgiou-Karistianis N, Gibson SJ, Giummarra MJ (2015) Oxytocin and the modulation of pain experience: Implications for chronic pain management. *Neurosci Biobehav Rev* 55:53–67.
- Treede R-D, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AKP (1999) The cortical representation of pain. *PAIN* 79:105–111.
- Tzabazis A, Mechanic J, Miller J, Klukinov M, Pascual C, Manering N, Carson DS, Jacobs A, Qiao Y, Cuellar J, Frey WH, Jacobs D, Angst M, Yeomans DC (2015) Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia Int J Headache* 36(10):943-50.
- Unger JW, Lange W (1991) Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. *J Chem Neuroanat* 4:299–309.
- Waite P (2015) Trigeminal Sensory System. In: *The rat nervous system*, Fourth edition., pp 817–851. Amsterdam: Elsevier AP.
- Williams PD, Bock MG, Evans BE, Freidinger RM, Pettibone DJ (1998) Progress in the development of oxytocin antagonists for use in preterm labor. *Adv Exp Med Biol* 449:473–479.
- Willis Jr. WD, Zhang X, Honda CN, Giesler Jr. GJ (2001) Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. *Pain* 92:267–276.
- Wilson L, Parsons MT, Ouano L, Flouret G (1990) A new tocolytic agent: development of an oxytocin antagonist for inhibiting uterine contractions. *Am J Obstet*

Gynecol 163:195–202.

Yirmiya R, Ben-Eliyahu S, Shavit Y, Marek P, Liebeskind JC (1990) Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res* 537:169–174.

Zhang ZW, Deschênes M (1998) Projections to layer VI of the posteromedial barrel field in the rat: a reappraisal of the role of corticothalamic pathways. *Cereb Cortex N Y N* 1991 8:428–436.