

03086
2
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

HABITUACION Y DESHABITUACION DE LAS RESPUESTAS REFLEJAS ESPINALES
POLISINÁPTICAS EN LA MEDULA ESPINAL DEL GATO: PAPEL DE LOS
OPIOIDES ENDOGENOS EN ESTOS PROCESOS.

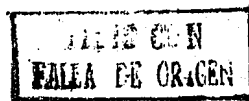
Tesis Para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias Fisiológicas

de

Francisco Pellicer Graham

DIVISION DE INVESTIGACIONES EN NEUROCIENCIAS DEL
INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA

1989





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes comunicaciones a congresos y publicaciones:

Pellicer, F., Calvo, J.M., Alvarado, R., Fernández-Guardiola, A.: Habitación y deshabitación de las respuestas reflejas espinales provocadas por estimulación eléctrica del N. sural en el gato: acción de la naloxona en estos procesos. XXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima. Colima, Col. Julio, 1983.

Pellicer, F., Calvo, J.M., Fernández-Guardiola, A.: Habitación y deshabitación de las respuestas reflejas polisinápticas en el gato espinal. XXVII Congreso nacional de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Morelia. Morelia, Mich. Julio, 1984.

Pellicer, F., Calvo, J.M., Fernández-Guardiola, A.: Habituation and dehabituation of the spinal polysynaptic reflex responses: modifications produced by naloxone and opiates. Society for Neuroscience. vol. 10, pp. 486, abs. 142.7, 1984.

León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Martínez-Servín, M., Pellicer, F.: Demostración inmunohistoquímica de terminales encefalínérgicas sobre motoneuronas de la médula espinal del gato. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Universidad de Querétaro. Querétaro Gro. Agosto, 1988.

Pellicer Graham, F.: Procesos de sensibilización y habitación en la médula espinal de los mamíferos. III Reunion de investigación, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Memorias, pp. 109-115, 1986.

Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., and Calvo, J.M.: Sensitization and habituation in cutaneous polysynaptic pathways of the cat spinal cord. Possible role of enkephalinergic processes. In A. Gorio et al. Eds., Development and Plasticity in Mammalian Spinal Cord. Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York. pp. 70-71, 1984.

Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., León-Olea, M., Asai, M., Sánchez-Alvarez, M.: Habituation and dehabituation of the spinal polysynaptic reflex responses: Modifications by naloxone and opiates and their anatomical correlates. Neuropeptides (en prensa) 1989.

Agradezco la asesoría del Dr. Augusto Fernández-Guardiola en la realización de esta tesis doctoral, así como la asistencia técnica, en la parte experimental, de Armando Solórsano. Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Neurofisiología de la División de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría, México, con el apoyo parcial del CONACYT, proyectos: PCSABNA-022624 y P228CCOX-880257 y del Sistema Nacional de Investigadores, 88-2297.

Agradezco especialmente a la Dra. Martha León-Olea, del laboratorio de histología del IMP, por su colaboración en la realización de los experimentos inmunohistoquímicos.

"Temblarás más al pronunciar
la sentencia que yo al recibirla".
A Jordano Bruno (1548-1600),
porque por menos que esto
murió en la hoguera.

INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCION.....	6
El proceso de habituación en la médula espinal.....	8
Citoarquitectura de la sustancia gris medular, localización de los opioides endógenos.....	12
Figura 1.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	23
Preparación biológica.....	23
Administración de fármacos.....	24
Estimulación y Registro.....	25
Figura 2.....	25
Análisis de resultados y estadística.....	28
Figura 3.....	29
Figura 4.....	30
Procedimiento Inmunohistoquímico.....	31
RESULTADOS.....	33
Figura 5.....	35
Figura 6.....	36
Tabla I.....	38
Figura 7.....	39
Figura 8.....	40
Figura 9.....	42
Figura 10.....	43
Figura 11.....	45
Figura 12.....	46
Figura 13.....	47
Figura 14.....	48
DISCUSION.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	56

RESUMEN

El fenómeno de habituación en el sistema nervioso central consiste en la disminución progresiva de la respuesta que se produce cuando un estímulo, en un principio nuevo, se presenta repetidamente a intervalos fijos. Aunque la habituación está bien documentada a nivel fenomenológico, aún no están claros los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo en la médula espinal del mamífero. Esta tesis propone una acción inhibitoria progresiva de las endorfinas espinales como parte importante de los mecanismos responsables de la habituación de las respuestas polisinápticas medulares, provocadas por la estimulación iterativa (0.2 Hz.) en el nervio sural. Para probar esta hipótesis se realizaron experimentos con gatos en preparación espinal aguda, paralizados, descerebrados y sin anestesia. Se encontró un decremento progresivo de la respuesta refleja (habituación) a la estimulación del N. sural, registrado en la raíz ventral. El potencial de campo, registrado con microelectrodos en las láminas IV-V de Rexed, aumentó su voltaje progresivamente durante la estimulación periódica alcanzando el máximo cuando el reflejo en la raíz ventral presentaba la mínima amplitud. La administración i.v. de un antagonista de los opiáceos, clorhidrato de naloxona, durante la máxima habituación, produjo deshabuación. En cambio la administración de naloxona, previa a la estimulación iterativa impidió la habituación de las respuestas. Por otro lado la microinyección, en la médula espinal de un agonista encefalinérgico, D-ala-2 Met-enkefalina, indujo una disminución en la frecuencia de disparo de la actividad unitaria de la raíz ventral. Estos resultados concuerdan con el postulado de la hipótesis de la inhibición activa como el mecanismo responsable de la habituación en la médula espinal, y sugiere que los péptidos opioides estén relacionados en este proceso.

INTRODUCCION.

La habituación es un fenómeno general del Sistema Nervioso Central (SNC), que consiste en la disminución progresiva de la respuesta bioeléctrica y conductual que se produce cuando un estímulo, en un principio nuevo, se presenta repetidamente a intervalos fijos, (Harris, 1943).

El fenómeno de la habituación fue descrito, en sus inicios, de manera conductual por Pavlov, (1927); aunque utilizó el término de "inhibición interna" para connotar la disminución paulatina de una función o de un patrón conductual. Otros de los trabajos pioneros fueron los realizados por Dodge, (1923) en el que describe la habituación al reflejo de nistagmus postrotatorio, y por King, (1926) donde reporta la influencia de la rotación repetida en pichones ciegos.

Una vez instalado el fenómeno de habituación es posible recobrar las respuestas bioeléctricas o conductuales mediante la suspensión del estímulo, o por la modificación de cualquiera de los parámetros con los que se instauró, es decir, un cambio en la intensidad o en la frecuencia del mismo, (Sherrington, 1906; Harris, 1943; Spencer, Thompson, Neilson, 1966).

El fenómeno de la habituación, además de presentarse de manera general en el SNC, con casi cualquier modalidad sensorial, inclusive mediante la estimulación repetitiva que produce dolor soportable (Condés-Lara y col., 1981); está presente en especies que van desde los insectos (Thorpe, 1956), hasta el hombre. (Knott y Henry, 1941). De aquí que la habituación varíe dependiendo de los parámetros con los que se

instaure, el sujeto experimental que se utilice, el sitio en el SNC en el que se estudie, etc. Se han hecho distinciones entre los procesos de habituación a corto plazo, minutos a horas (Sarpless y Jasper, 1956), y los de largo plazo, días e inclusive semanas (Cstellucci y col. 1978). También se ha caracterizado a la habituación como un modelo de aprendizaje negativo, (Hernández-Peón y col., 1958, Hernández-Peón, 1960), es decir, el fenómeno mediante el cual se aprende de manera paulatina, a dejar de responder a un estímulo que carece de significado funcional o que es prescindible para la supervivencia. Dada la diversidad de expresiones y los cambios que produce el fenómeno de la habituación en el SNC, sobre todo a largo plazo, se le ha situado en el campo de la plasticidad (Konorski, 1948; Harris, 1943).

Las características fenomenológicas y paramétricas de la habituación están bien documentadas, (Thompson y Spencer, 1966), a continuación las describimos:

1. La habituación se establece cuando se estimula el Sistema Nervioso, (SN) en forma monótona. El resultado del decremento de la respuesta provocada por la estimulación es la habituación; este decremento es usualmente una función exponencial negativa del número de veces que se estimula.
2. Si el estímulo es suspendido o se modifica su patrón, esto es, se aumenta o disminuye la frecuencia de estimulación o su intensidad, la respuesta tiende a recobrase.
3. Si se dan series repetidas de estímulos que habitúen y deshabitúen las habituaciones sucesivas se presentan más rápidamente, lo que se denomina como potenciación de la

habituaación.

4. Si se aumenta la frecuencia de estimulaación, la habituaación se hace más rápida y mas pronunciada dependiendo del sitio del SNC en donde se esté estimulando.

5. Los estímulos débiles producen habituaación más rápida o más pronunciada.

6. Los efectos de la habituaación pueden prolongarse más abajo de cero, o del nivel de respuesta sintótica; es decir, cuando se estimula de forma monótona por tiempo prolongado, inclusive después de la desaparición de la respuesta.

7. La habituaación de las respuestas puede estar dada por cualquier tipo de estímulo.

8. La presencia de otro estímulo, distinto al utilizado para producir habituaación recupera la respuesta habituada.

9 Si se aplica repetidamente un estímulo deshabituaante, este estímulo de deshabituaación puede producir en si mismo habituaación.

El proceso de habituaación en la médula espinal

El primero en analizar la disminución de las respuestas espinales reflejas, en la preparación aguda de perro, fue Sherrington (1906); que aunque no utilizó el término habituaación, sino fatiga, para describir el fenómeno; encontró que la estimulaación mecánica o eléctrica repetida aplicada en la piel, tenía como consecuencia el decremento de los reflejos de rascado y de flexión en el animal espinal. También observó que la

recuperación de los reflejos ocurría después de algunos segundos de descanso.

Prosser y Hunter (1936), realizaron un estudio extenso sobre la habituación y deshabituación del reflejo de flexión con la preparación de rata espinal crónica, utilizando para producir la habituación, estímulos eléctricos o mecánicos en las patas, cola y nervios del tren posterior. Demostraron que es posible la habituación de las respuestas, la recuperación espontánea y la deshabituación causada por un estímulo más fuerte que el habitante; también puntualizaron que los estímulos débiles producen habituación más rápidamente que los de mayor intensidad.

Buchwald y col. (1965) realizaron experimentos en gatos espinales agudos, en los que reportaron habituación de la descarga unitaria de motoneuronas registradas en la raíz ventral. Encontraron que unidades eferentes silentes, sin actividad espontánea, con respuestas fásicas de gran amplitud, presentaban un decremento progresivo en su respuesta a la estimulación repetitiva. En cambio las unidades de descarga tónica presentaban, en algunos casos, disminución en su respuesta y facilitación en otros. Estos autores puntualizaron que los cambios de la respuesta refleja espinal están mediados centralmente, y no interviene en ella la adaptación de los receptores. También encontraron que los cambios en la presión arterial de los animales de experimentación no se acompañan de cambios en la descarga de las unidades eferentes.

Spencer, Thompson y Neilson (1966), trabajando también con gatos en preparación espinal aguda, coinciden con los resultados

de Buchwald y col. (1965), y de Prosser y Hunter (1936), en que la habituación y la recuperación de los reflejos no depende de factores sistémicos como la presión arterial o agentes químicos circulantes y que este proceso es de naturaleza enteramente neuronal. Reportaron que los grandes decrementos en las respuestas reflejas se obtienen con estímulos de baja intensidad (umbrales). Por otra parte mostraron que el proceso de habituación está presente aún cuando se interrumpa la entrada o la salida del sistema gama eferente. Sus resultados sugieren que la restauración de la respuesta por extraestímulos es el resultado de un transiente facilitador, relacionado con la interrupción del proceso responsable del decremento. En otro trabajo, Thompson y Spencer (1966), concluyen que el proceso de habituación del reflejo flexor espinal puede representar un efecto acumulativo de la depresión polisináptica de baja frecuencia y que la deshabituación es un tipo de sensibilización sobrepuesta, como resultado de una postdescarga facilitatoria.

Se han vinculado estrechamente los procesos de habituación y sensibilización, aunque existen puntos contradictorios de si comparten mecanismos neuronales o éstos son procesos separados. En este sentido, Groves y col., (1969); Groves y Thompson, (1970) proponen un substrato anatómico distinto para cada proceso. En concordancia con el trabajo de Thompson y Spencer, (1966) antes citado, Groves reportó que las células que se encuentran entre las láminas II-IV de Rexed, (1952) se habitúan y las que se encuentran en las láminas VI-VII presentan los dos procesos, sensibilización y habituación. Posteriormente Egger, (1978)

encontró una diferencia de localización entre las unidades que se habitúan y las que presentan los dos procesos y reportó que las unidades que producen el patrón sensibilización-habituación en el reflejo plantar se localizan entre las láminas V-VII y son de umbral intermedio y de latencia larga a diferencia de las que se habitúan, que se localizan en las láminas III-IV, también de umbral intermedio pero de latencia corta y concluye que el modelo de "proceso dual" que relaciona circuitos neuronales independientes es innecesario para explicar la sensibilización-habituación del reflejo plantar. En este mismo sentido Farel, (1974) con experimentos realizados en médula espinal de rana propone que el "proceso dual" se puede llevar a cabo en la misma sinapsis, aunque no descarta vías anatómicas distintas para estos fenómenos en otras preparaciones.

Por otro lado se han buscado organismos con sistemas nerviosos menos complejos para estudiar éste fenómeno. El grupo de Kandel, (1977), Carew y col. (1979) en experimentos realizados en Aplysia, aportan pruebas de que el mismo circuito neuronal con el que se produce la habituación, se produce sensibilización a largo plazo, los dos mecanismos son el resultado de cambios en la liberación del neurotransmisor por la neurona sensorial.

Castellucci y col. (1970, 1978) han estudiado el fenómeno de habituación en el ganglio neural de la Aplysia californica, proponen que la habituación se debe a la disminución en la liberación del neurotransmisor de la neurona presináptica sensitiva, provocada por la estimulación iterativa y que tiene como consecuencia la falta de activación progresiva de la

motoneurona. Esta forma de plasticidad neuronal es llamada homosináptica, por estar restringida a la vía sináptica estimulada. Con base en éstas evidencias se dió lugar a la hipótesis de la depresión sináptica.

Otra hipótesis propuesta para la explicación del fenómeno de la habituación es la "inhibición activa", (Wickelgren, 1967, Pearson y MacDonald, 1973) ésta propone que dentro de la cadena de interneuronas relacionada con la habituación -vía de la habituación- existe una interneurona inhibitoria que al activarse progresivamente da lugar al fenómeno.

Citoarquitectura de la sustancia gris medular, localización de los opioides endógenos

Los estudios anatómicos, inmunohistoquímicos y neurofarmacológicos sobre las relaciones que tienen las neuronas de la sustancia gris medular, así como las sustancias que median la transmisión de las distintas aferencias de ésta, han aportado el conocimiento para entender el papel que juegan en la transmisión de la información neuronal, así como el de los procesos fisiológicos fundamentales del sistema nervioso.

Rexed (1952) efectuó un estudio en la sustancia gris de la médula espinal en el que la describe como una estructura formada por capas celulares similares a las de la corteza cerebral o el tálamo y hace hincapié en la base citoarquitectónica del estudio. Divide a la sustancia gris medular en X capas celulares que denomina láminas, como se muestra en la figura 1. Rexed describió estas láminas como conglomerados reconocibles de cuerpos

celulares, con una profusa red de interconexiones entre ellas, como lo demostraron trabajos posteriores de Proshansky y Egger, (1977) y los de Scheibel y Scheibel, (1969).

A continuación se describirán las características morfológicas principales de las células que componen las diversas láminas con base en los trabajos de Rexed, (1952, 1964), y agregando algunas características fisiológicas fundamentales.

Lámina I. Los cuerpos neuronales se encuentran formando la parte más superficial (dorsal), de la sustancia gris, son de tamaño pequeño y medio y en ellas se lleva a cabo el primer relevo de la información sensorial. Por ésta delgada lámina cruzan múltiples fibras delgadas y medias (A delta y C). Se ha documentado por varios autores (DiFiglia y col., 1982; LaNerolle y LaMotte, 1983; Cuello, 1987; Yaksh y col. 1988.) usando técnicas variadas: inmunohistoquímica, radioinmunoensayo (RIA) y degeneración por rizotomía, que los aferentes primarios que hacen sinapsis en éstas células contienen sustancia P, aunque existen reportados otros neuromoduladores como: el péptido intestinal vasoactivo, (VIP) y la somatostatina no se les ha relacionado directamente con la transmisión de información nociceptiva.

Lámina II. Esta es la estructura que junto con la lámina III, se denomina " sustancia gelatinosa de Rolando" y es de hecho la única lámina que tiene representación continua desde el tallo cerebral hasta el filum terminale. Se ha dividido a la lámina II en dos porciones: externa e interna, la primera se encuentra dorsal y la constituyen células un poco más pequeñas que la interna y con fibras amielínicas, la porción interna tiene fibras

mielínicas de pequeño diámetro y amielínicas. Las prolongaciones de estas neuronas se extienden, tanto rostro-caudalmente, como a láminas adyacentes (IV-V) en sentido dorso-ventral. Son a estas

LAMINAS DE REXED EN LA MEDULA ESPINAL DEL GATO

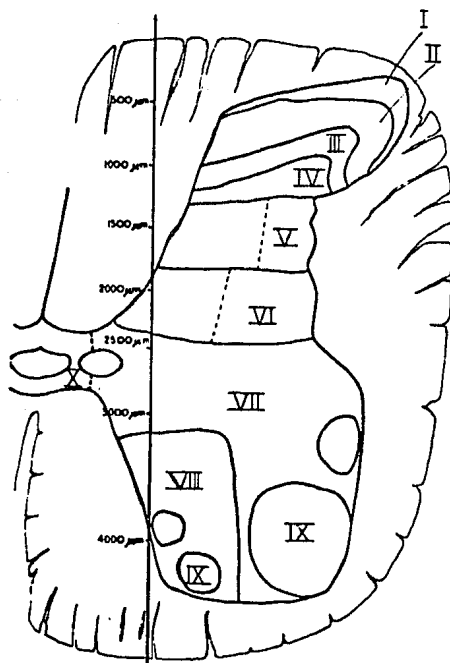


Figura 1. Esquema modificado de Rexed donde se muestra la organización laminar en un corte transversal de médula espinal de gato, a nivel lumbo-sacro. La graduación sobre la barra vertical corresponde a la profundidad en micrómetros a la que se encuentran las láminas. Rexed, (1952); J. Cell. Comp. Neurol., 96: 415-466.

neuronas a las que se les atribuye un papel relevante en los mecanismos de transmisión nociceptiva, (Melzak y Wall, 1965; Cervero e Iggo, 1980; Yaksh y Noueihed, 1985).

Lámina IV. Las células de ésta capa se diferencian poco con las de la III y su borde ventral es difuso con la lámina V, los cuerpos neuronales son estelares o triangulares y de tamaño pequeño y medio aunque en ocasiones se observen de gran tamaño. Por responder a distintas modalidades sensoriales no dolorosas, a estas células se les denomina de amplio rango dinámico, (Wall, 1967).

Lámina V. Esta se localiza en la parte denominada el cuello del asta dorsal, se divide en una zona lateral que ocupa el tercio externo, presenta una apariencia reticulada y la zona medial, los dos tercios internos. Muchas fibras cruzan la lámina en forma transversal hacia la parte reticulada. La forma de las células es triangular y de tamaño grande en la pars lateral y de tamaño medio en la pars medial; a diferencia de las neuronas de la lámina IV, que no presentan una orientación definida las células de ésta se encuentran orientadas en dirección mediolateral. Algunas de las neuronas forman el haz espino-talámico-lateral y juegan un papel importante en el sistema de compuerta de la información aferente nociceptiva (Melzak y Wall, 1965; Wall, 1978; Yaksh, 1981; Ruda, 1982).

Lámina VI. Esta lámina tiene su representación típica en los engrosamientos medulares (cervical y lumbar) y se divide, al igual que la V, en una zona medial, ocupando un tercio, y en una lateral. La zona medial tiene células conglomeradas y de menor

tamaño que la lateral. Las formas que presentan estas células son triangulares o estrelladas. Esta lámina recibe información propioceptiva originada en el movimiento de las articulaciones, aunque también a la estimulación cutánea, (Wall, 1967).

Lámina VII. Ocupa la mayoría de la zona intermedia de la sustancia gris y en los engrosamientos medulares se vuelve más compleja, limitando medialmente con la lámina VIII y lateralmente con la IX. Las células están homogéneamente distribuidas y son de forma estelar o triangular de tamaño medio. Esta lámina es particularmente importante por dos hechos: i) en su parte lateral llegan las fibras del núcleo rubro espinal, y ii) en su parte más ventral y lateral, es decir, junto al núcleo motor de la lámina IX, se encuentran unas fibras recurrentes, estudiadas en un inicio por Cajal (1910), que inhiben la actividad de las motoneuronas mediante una interneurona inhibitoria (Renshaw, 1941, 1946).

Lámina VIII. Se encuentra situada en la parte medial ventral de la sustancia gris, existen diversos tamaños de células aunque las más grandes son menores que las motoneuronas de la capa IX. Se encuentran numerosas fibras que cruzan, vía trans comisural, a la lámina VIII contralateral, su papel funcional es determinante en la integración del reflejo cruzado.

Lámina IX. Está localizada en la parte más ventral y lateral de la sustancia gris, en ella se encuentran varios núcleos motores, que aunque tiene representación a lo largo de toda la médula espinal, aumenta en los engrosamientos a causa de las grandes masas musculares que inervan en las regiones cervical y

lumbar. En ésta capa se encuentran las neuronas más grandes de la médula espinal de forma triangular o poliédrica. Estas neuronas están ampliamente conectadas con otras láminas principalmente con la VI, VII y VIII, y recientemente se han reportado conexiones de láminas dorsales con estos núcleos motores, (Atsumi y Sakamoto, 1987; León-Olea y col. 1988).

Lámina X. También se le denomina a esta zona, sustancia gris central y está constituida por células gliales y fibras amielínicas.

Existen amplias evidencias que indican que la médula espinal es un sitio importante de proceso de información en los que intervienen sistemas peptidérgicos, con particular atención en los opioides, Aronini y col.(1981). Hunt y col. (1981), realizaron estudios de microscopía electrónica e inmunohistoquímicos donde localizan metionina-enkefalina y sustancia P en las láminas I y II.

Existen también pruebas de la existencia de estos péptidos opioides en las neuronas relacionadas con la transmisión y modulación de la información sensorial y nociceptiva en la médula espinal, Miller y Seybold, (1987). Ruda, (1982); utilizando una técnica combinada de inmunohistoquímica y marcado retrógrado con peroxidasa de rábano, encontró que las células de la lámina V, que proyectan al tálamo, tienen en su soma receptores a encefalinas. Estas observaciones demostraron que el principal sitio sináptico de modulación encefalinérgica en la transmisión de información nociceptiva es la lámina V. Asimismo, Fields y col. (1980) reportaron que dos tipos de receptores opiáceos: el

MU, con mayor afinidad por la morfina y el DELTA, con mayor afinidad por las encefalinas, se encuentran en los aferentes primarios de pequeño diámetro y apoyan la idea de que existen dos poblaciones separadas de receptores, una pre y otra postsináptica y con una proporción más grande del DELTA en los elementos postsinápticos del asta dorsal de la médula espinal. Por otro lado, LaMotte y col. (1976), reportaron que además de una gran cantidad de receptores a opiáceos en las láminas II y III, se encuentran receptores en el asta ventral. Glazer y Basbaum, (1981) relizaron un estudio de localización inmunohistoquímica de Leucina-encefalina en médula espinal de gato en el que reportan una gran distribución en el pericarion de células de la lámina I, II y X, especialmente en la pars interna de la II. La lámina V presentó inmunoreactividad moderada, por lo cual concluyen que muchas de éstas células son morfológicamente similares y convergen en regiones conocidas de proyección.

En un trabajo reciente, Yaksh y col. (1988). mediante el método de RIA, en cuatro especies diferentes hacen un estudio comparativo de la distribución de varios péptidos, incluida la met-encefalina y encuentra que en los segmentos lumbo-sacros, de todos los animales estudiados existe una relación de 2:1 y 3:1 de met-encefalina entre la pars dorsal y la ventral. Estos resultados concuerdan con la distribución de péptidos opioides, obtenidos por inmunohistoquímica, inclusive se niega la existencia de cuerpos neuronales que contengan péptidos opioides en el asta ventral, (Sar y col., 1979; Miller y Seybold, 1987).

Hasta aquí se han descrito algunas de las evidencias

morfológicas de la existencia y distribución de endorfinas y dinorfina en la médula espinal, en lo consecuente nos ocuparemos de estos péptidos y sus análogos sintéticos en la función espinal.

Algunas observaciones han demostrado claramente que los opioides ejercen un efecto directo en el procesamiento de la información sensorial y motora en la médula espinal. La administración sistémica de opiáceos a dosis bajas reduce selectivamente los reflejos de la raíz ventral evocados por estimulación térmica nociceptiva y por fibras A-delta y C, (Bell y Martin, 1977). También se ha demostrado la disminución de la actividad inducida por estimulación de aferentes de bajo umbral, es decir no nociceptivos, (Yaksh, 1978; Einspahr y Piercey, 1980).

La aplicación local de opiáceos (morfina, levorfanol, etc.) y de péptidos opioides (Met-enkefalina, Leu-enkefalina, etc.) en el asta dorsal inhibe la actividad evocada en neuronas por estímulos nociceptivos, térmicos o mecánicos, aplicados en campos sensoriales cutáneos, (Calvillo y col., 1974, 1979; Satoh y col., 1979).

En la mayoría de estos estudios la naloxona, antagonista de los opiáceos, administrada sistémicamente o por iontoforesis revierte la supresión producida por opiáceos y opioides. Godfarb y Hu, (1976) reportaron que la administración sistémica de naloxona produce un aumento en la amplitud de la respuesta refleja medular en el gato. En éste sentido, Henry, (1979) reportó que con dosis intravenosas bajas de naloxona (0.05-0.15 mg/kg) se produce un incremento en la descarga unitaria de

neuronas del asta dorsal (láminas I, IV, V y VI) en el gato y sugiere que el efecto de la naloxona es específico sobre la actividad unitaria nociceptiva. Sobre este punto existen reportes contradictorios, que se analizarán en extenso en la discusión.

De la misma manera la aplicación iontoforética de agonistas opiáceos y de naloxona en neuronas de las láminas IV, V y VI producen inhibición de la frecuencia de disparo con los primeros y aumento con la segunda, (Yaksh y Rudy, 1978; Zieglgänsberger y Tulloch, 1979). Estos trabajos confirman el papel modulador inhibitorio de los opioides endógenos medulares. Catley y col., (1980, 1984) demostraron un aumento en la amplitud de la actividad medular refleja extensora en más del doble del control, y en la flexora del 130 %; producidos con dosis bajas de naloxona (2.5 ug/kg i.v.) y atribuyen el aumento al antagonismo producido sobre la liberación tónica inhibitoria de los opioides endógenos.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio (Fernández Guardiola y col., 1982, Pellicer, 1988) se demostró en el gato, que la estimulación tetanizante repetida a intervalos fijos, cada 20 min, en aferentes cutáneos y musculares produce un aumento progresivo de la respuesta de la raíz ventral, mono y polisináptica que se acentúa con la administración de naloxona, (0.2-1.0 mg/kg i.v.). Este incremento progresivo de la amplitud de los reflejos mono y polisinápticos es revertido por la administración i.v. de pentazocina, un opiáceo sintético.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los múltiples trabajos encaminados a la comprensión del fenómeno de la habituación, y a casi un siglo del inicio sistemático de su estudio se han resuelto algunos puntos, es decir, está bien documentado el nivel paramétrico, (Thompson y Spencer, 1966); inclusive parece estar resuelto el fenómeno a nivel operacional para el caso de los moluscos, (Castellucci y col., 1970) pero no hay evidencias experimentales de que la depresión sináptica opere como el mecanismo en sistemas más complejos. No se ha determinado el arreglo sináptico ni el o los posibles neurotransmisores relacionados. Con los antecedentes mencionados proponemos a la médula espinal del gato como una estructura idónea para estudiar los puntos citados, dada la información acerca de su citoarquitectura y la localización de los neurotransmisores, así como la relativa facilidad de estimulación y registro de aferencias y eferencias específicas.

Proponemos que la activación progresiva de un grupo de neuronas inhibitorias endorfinérgicas forme parte del mecanismo responsable del fenómeno de la habituación de las respuestas motoras desencadenadas por la estimulación iterativa de baja frecuencia en una vía polisináptica. Para probar esta hipótesis, realizamos experimentos con la preparación de gato espinal agudo en los que se obtuvo la habituación de la respuesta evocada por la estimulación cada 5 seg. al nervio sural. Para documentar anatómicamente las interacciones de neuronas endorfinérgicas con interneuronas o motoneuronas de las distintas

láminas ventrales de Rexed se realizaron experimentos de inmunohistoquímica a leucina-encefalina.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Preparación biológica

Se utilizaron 20 gatos de 2 a 3 kg. de peso, de uno y otro sexo. Todos fueron anestesiados por inhalación intermitente de éter durante 10 min., se les practicó una traqueotomía y se canuló para suministrar ventilación artificial. Se seccionaron los nervios vagos con el fin de disminuir la caída de la presión arterial por la sección medular. Se canuló la arteria carótida izquierda para el registro de la presión arterial y se instaló un catéter en la vena safena para la administración de soluciones. Después de estos procedimientos, se realizó la sección de la médula espinal a nivel de las vértebras C-2, C-3 y se paralizaron por la administración intravenosa de galamina (Flaxedil), con una dosis inicial de 7-10 mg/kg, y posteriormente 3 mg/kg/h. Por medio de radiofrecuencia se lesionó la formación reticular mesencefálica, con las siguientes coordenadas estereotáxicas: anterior 2, lateral 2, altura -2; (Snider y Niemer, 1961) con el fin de producir una descerebración funcional. También se infiltró Xilocaina al 2% en los puntos de presión del estereotáxico y en las incisiones quirúrgicas. Se efectuó una laminectomía amplia para exponer los segmentos de la médula espinal L6, L7 y S1, así como sus raíces ventrales. Para preservar a las estructuras de la deshidratación se hizo, con la piel y músculos de la región, un depósito que se llenó con aceite mineral. Se disecó el nervio sural desde su emergencia del siático, y por dos o tres cm. de su trayecto sin cortarlo distalmente. En algunos experimentos

encontramos una segunda rama del sural (cutánea superficial), en estos casos se estimuló por delante de ella, es decir tomando al sural completo, en la figura 2 se muestra una micrografía de bajo aumento (8X) del nervio sural del gato. También los nervios se cubrieron con aceite mineral. En todos los casos se disecaron y cortaron las raíces ventrales L6, L7 y S1 para su registro. La temperatura de los gatos se mantuvo entre 37 y 38 C mediante calor radiante y la frecuencia cardíaca fue continuamente registrada en un tacógrafo electrocardiográfico. Para los experimentos todos los animales se colocaron en un aparato de fijación para médula espinal.

Administración de Fármacos

El clorhidrato de naloxona (DuPont), se administró intravenoso a una dosis de 0.8 mg/kg. Esta dosis se determinó, por nuestros experimentos de acumulación de la potenciación postetánica, con los que se obtuvieron resultados con dosis que fluctuaron entre 0.2 y 1.0 mg/kg., mismas con la que se consigue ocupar por completo los receptores a opiáceos, (Pellicer, 1988). En los experimentos en los que se microinyectó D-ala-2-Metionina-encefalina, (DAME), (Sigma) el procedimiento se realizó mediante un dispositivo micrométrico y una jeringa Hamilton de 5 μ l, montado en una torre de micromanipulación estereotáctica, (David Koff). Las microinyecciones se realizaron con la microjeringa situada 400-500 μ m caudal al microelectrodo de registro y a una profundidad de 1500 μ m de la superficie dorsal de la médula. Las dosis utilizadas fueron de 1 μ g en 250 nl, disueltas en solución fisiológica y administradas durante 1 min, en el control solo se microinyectó el mismo volumen de solución fisiológica.

Estimulación y Registro

Para la estimulación del nervio sural se colocaron electrodos bipolares de platino tipo gancho.

En la médula espinal, se colocaron electrodos de registro en varios sitios: uno bipolar de platino en la superficie dorsal de la médula ipsilateral al estímulo, con el fin de registrar el

NERVIO SURAL DEL GATO



Figura 2. Micrografía de bajo aumento (8X), del nervio siático del gato, (rama gruesa) y la emergencia del nervio sural (flecha). La estimulación se hizo mediante un electrodo bipolar de platino situado a 2 cm. de la entrada al siático (asterisco).

potencial de activación aferente y que denominaremos salva aferente. Otro, bipolar de platino tipo gancho para el registro de la raíz ventral y un microelectrodo de tungsteno o una micro pipeta de vidrio para el registro del potencial de campo o la actividad multiunitaria, cambiando las constantes de filtrado para uno y otro caso, (potencial de campo, 3 Hz.-3 kHz., actividad unitaria, 300 Hz.-3 kHz.). Con la preparación montada, y después de tres y media h. de suspendida la administración de eter, (como mínimo) se probaron los reflejos mediante la estimulación de choques simples al nervio sural, con los cuales se determinó el umbral de aparición de la respuesta en la raíz ventral que dio la respuesta de mayor amplitud (fibras A-beta). Las señales que se obtuvieron se enviaron a amplificadores de CA, (Grass, P 511-k) con una punta de alta impedancia para las señales registradas con microelectrodo. Las respuestas se grabaron en cinta magnética en frecuencia modulada por un sistema Ampex PR 2200, y se visualizaron en un osciloscopio de rayos catódicos de memoria, (Tektronix D 513) y procesaron en línea mediante una computadora de propósito específico (Nicolet, 1170).

Se determinó utilizar al nervio sural para la estimulación iterativa por diversas razones: i) Es un nervio constituido por axones de pequeño y mediano diámetro (0.1-5 μm .), esto incluye a las fibras A-beta, B y C, lo que determina que la información que transmite es primordialmente sensorial, (Clark y col., 1935; Ochoa, 1971). ii) La respuesta evocada en la raíz ventral por la estimulación de este nervio se hace através de varios relevos sinápticos, donde se sabe que se ejerce modulación endorfinérgica, (Yaksh, 1981). iii) Existen controversias acerca

de si el sural es unicamente sensitivo o tiene componentes motores en roedores, (Martínez-Gómez y col., 1986) la información al respecto, en el gato, es escasa aunque en el hombre se reporta como un nervio sensorial, (Hensel y Boman, 1960) pudiendose afirmar que en nuestros resultados anteriores, (Pellicer, 1988) con la misma preparación la estimulación de este nervio no produce respuestas monosinápticas en la raíz ventral.

El nervio sural se estimuló, (estimulador Grass S 88) con pulsos rectangulares de 0.3 ms de duración y a una frecuencia de 0.2 Hz. La intensidad del estímulo fue de 2 a 3 veces el umbral, para las fibras A-beta, la corriente utilizada se mantuvo entre 150 y 1500 μ a.

Con el fin de determinar el sitio de registro de los microelectrodos, se llevaron a cabo dos procedimientos: i) En el caso del registro con microelectrodos de tungsteno se marcó el sitio de registro mediante una lesión puntiforme, producida con radiofrecuencia. ii) En el caso del uso de micropipetas de vidrio, éstas se llenaron con una solución de KCl 0.8 M y azul de pontamina al 4 %. Los sitios de registro se marcaron por iontoforesis de la pontamina, con 20-50 μ a durante 20 min, la resistencia de los electrodos fue de entre 5 y 10 Mohms. La figura 3 muestra un corte transversal del primer segmento sacro de médula espinal de uno de los experimentos, donde se señala una marca por iontoforesis de azul de pontamina. En todos los casos se realizó la técnica histológica del procedimiento rápido (Guzmán-Flores y col. 1958), modificado (Sánchez- Alvarez y col., 1988) para la localización de las marcas, ver figura 3.

Análisis de resultados y estadística

Una vez amplificadas y grabadas las señales de la salva aferente, (SA), el potencial de campo, (PC), y el reflejo de la raíz ventral, (RV); se procesaron en una computadora de propósito específico (Nicolet 1170), se promediaron ocho potenciales y se determinó el área de su integral, éstas se graficaron, (graficador HP 7044-B x-y) en papel, se recortaron y pesaron. Al valor de las áreas de los controles se les asignó el 100% . El análisis de la frecuencia de la actividad unitaria y multiunitaria se realizó mediante un codificador de frecuencia, (Nicolet 1070) y una ventana de voltaje con la que se discriminó la amplitud de la actividad a cuantificar.

Las pruebas estadísticas que se utilizaron fueron el análisis de varianza no paramétrico de dos clasificaciones por rangos de Friedman con el que se probó la homogeneidad de la población y la diferencia significativa de los rangos; La otra prueba fue la de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon, esta es una prueba de tendencias, es decir, otorga mayor significado a las muestras con más diferencias, (Siegel,1956).

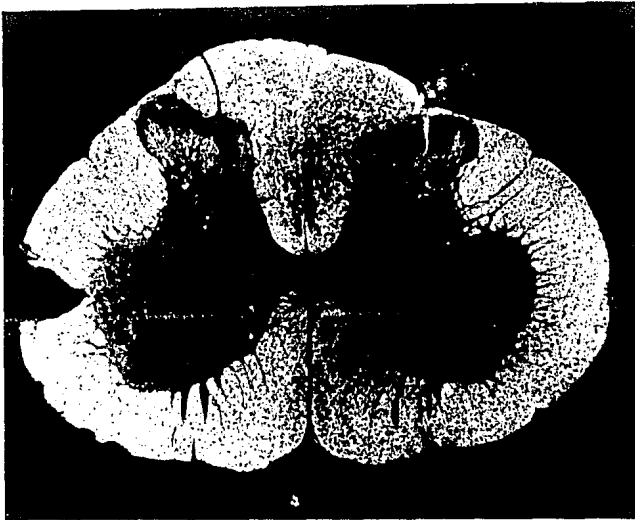


Figura 3. Se muestra una micrografía a bajo aumento de un corte de 50 μm de espesor del primer segmento sacro de médula espinal de gato mediante la técnica del procedimiento rápido modificado. Nótese la marca puntiforme en, tono claro entre las láminas VI y VII de Rexed, en el círculo negro de la derecha.

En la figura 4 se ilustra de manera esquemática el dispositivo experimental utilizado en esta tesis.

ESQUEMA DE LOS LUGARES Y EL MODO DE ESTIMULACION PARA PRODUCIR HABITUACION EN EL GATO ESPINAL AGUDO

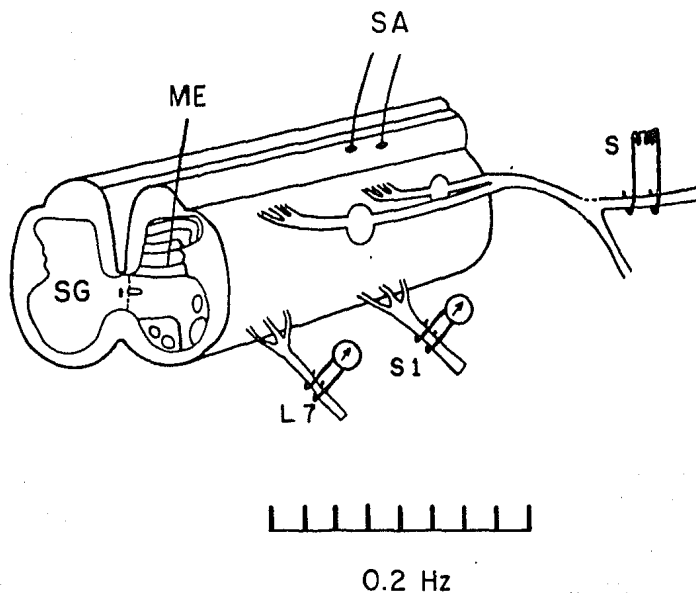


Figura 4. Se ilustra esquemáticamente el sitio de estimulación en el nervio sural (S). SA; ejemplifica el sitio de registro de la salva aferente. ME; el microelectrodo con el que se registra el potencial de campo o la actividad unitaria en la sustancia gris medular (SG). L7 y S1 son las raíces ventrales donde se registran los reflejos medulares. La parte inferior muestra el esquema de estimulación: pulsos rectangulares de 0.3 ms de duración a 0.2 Hz.

Procedimiento Inmunoquímico

Para el procedimiento inmunoquímico se utilizaron tres gatos de entre 2 a 3 kg. de peso. Se anestesiaron con pentotal sódico (33 mg/kg., i.p.) y se perfundieron mediante un catéter intracardiaco con solución fisiológica para lavado, y posteriormente con paraformaldehído al 4%, en una solución amortiguadora de fosfatos a 0.1 M con un ph de 7.4.

Mediante una laminectomía de las vértebras lumbo-sacras se obtuvo la médula espinal. Posteriormente se postfijó, durante tres horas en la solución de perfusión, se equilibró el tejido en pasos sucesivos de sacarosa 12, 16 y 18 % y se cortó por congelación en secciones de 25 μ m. de espesor, (Kryostat Leitz 1720).

Para el procedimiento inmunoquímico se utilizaron dos métodos: complejo avidina-biotina-peroxidasa, (Vector Labs.) revelado con 3,3' diaminobenzidina (Sigma). Este método consiste en la incubación del tejido durante 24 h., con el primer anticuerpo anti leucina-enkefalina, desarrollado en conejo, después de lavado con solución amortiguadora de fosfatos, ph 7.4 y tritón al 0.3 % el tejido se incubó por 20 min. en suero normal de cabra, posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo biotinilado, cabra anti conejo y se realizó una tercera incubación con el complejo avidina-peroxidasa. El segundo método usado fue el indirecto de inmunofluorescencia (Coons,

1958), con los mismos pasos que el anterior, con la diferencia que al segundo anticuerpo se le incorpora el isotiocianato de fluoresceína, que se hace visible mediante la emisión de luz ultra violeta.

El anticuerpo para leucina-encefalina se obtuvo de conejo. La especificidad y las reacciones de cruzamiento se probaron por radioinmunoensayo, y los valores fueron: leucina-encefalina; 100 %, metionina-encefalina oxi; 0.28 %, metionina-arginina; 0.15 %, beta-endorfina; 0.01 %, metionina-encefalina; 15 %. (Vindrola y col. 1981). La especificidad del anticuerpo en el tejido se confirmó por la preadsorción del anticuerpo primario diluido 1:100 con leucina-encefalina sintética, (Sigma) a una concentración de 10^{-4} M. lo cual inhibió completamente la inmunoreactividad. El otro control usado fue la omisión del antisuero primario o la incubación en suero no inmune.

RESULTADOS

En todos los animales registrados encontramos una disminución progresiva de la amplitud (voltaje) de la respuesta refleja registrada en la raíz ventral S1 (habituaación), principalmente en aquellos componentes situados ente 12 y 16 mseg., al aplicar estímulos eléctricos, en forma iterativa al nervio sural, estimulando fibras A-delta y B. La máxima habituaación de la respuesta refleja se obtuvo entre 30 y 120 min del inicio de la estimulaación iterativa. La deshabituaación de la respuesta refleja se produjo en ocasiones de manera espontánea y siempre por suspensión del estímulo por 10 min. o por estimulaación táctil de la piel de la pata estimulada. La salva aferente mostró variaciones discretas en su amplitud, es decir, aumentos o disminuciones en el voltaje no significativas, durante la estimulaación iterativa. El potencial de campo presentó diversos cambios dependiendo del sitio donde se registró; cuando se registró la lámina VI o la parte superficial de la VII, no se encontraron cambios ni en la amplitud ni en el valor de su integral, expresada como el área bajo la curva. Cuando se registró la lámina IV o V presentó un aumento progresivo, particularmente en los componentes entre 3 y 7 mseg. obteniendo su máximo cuando el potencial de la raíz ventral presentaba la máxima habituaación. Por el contrario, cuando se registró en la parte profunda de la lámina VI y en la IX disminuyó concomitantemente a la respuesta de la raíz ventral, durante el

proceso de habituación, ver figura 10. Con la figura 5, se ilustra un experimento típico de habituación, donde se observan la SA el PC de la lámina V, registrado con un microelectrodo y la respuesta de RV registrada en S1, la deshabitación por suspensión del estímulo y la interrupción del proceso por la administración de naloxona. En la figura 6, se ilustran los cambios en las áreas de los potenciales de la SA, RV, y PC; obtenidos mediante la integración del promedio de ocho potenciales. El promedio de cada tríada fue tomado cada 5 min. Nótese la disminución progresiva del area del reflejo marcado con RV, que muestra algunas deshabitaciones espontáneas como las que se observan en H6 y H10, y la marcada diferencia entre el control (C) y H15, máxima habituación obtenida a los 75 min. de estimulación continua. Se muestra también el aumento en el area por la deshabitación. La SA presenta cambios discretos al igual que el PC.

HABITUACION SURAL 0.2 Hz DESHABITUACION Y NALOXONA

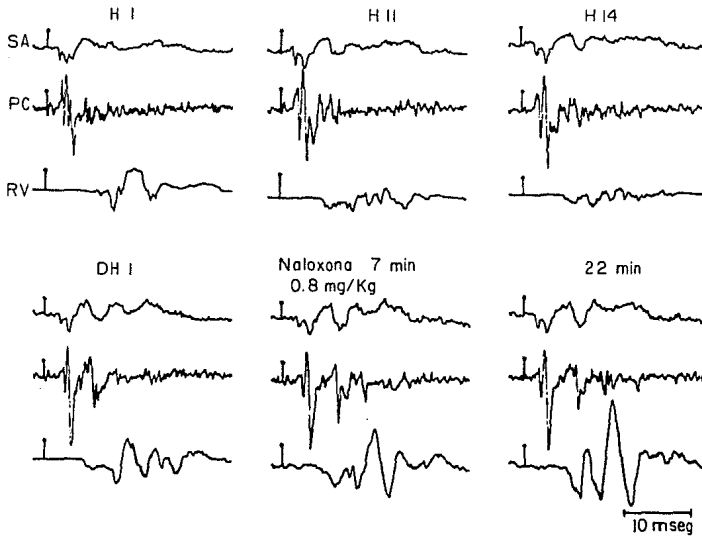


Figura 5. Se ilustra el proceso de habituación por estimulación repetida (0.2 Hz. en el nervio sural) y después de la administración de naloxona a una dosis de 0.8 mg/kg. i.v. Cada trazo es el promedio de 8 potenciales. SA no muestra cambios durante el proceso de habituación, con la administración de naloxona se acentúan y aparecen componentes de más de 10 ms. de latencia. El PC presenta un aumento progresivo de su amplitud, (componente a 4 ms. de latencia), especialmente de los tardíos (8-15 ms.), la naloxona acentúa este hecho. RV muestra la disminución progresiva, (H11, 55 y H14, 77 min. de iniciada la estimulación) de su amplitud, la recuperación de la amplitud por deshabitación (DH 1) y el aumento de la amplitud después de la administración de naloxona (componentes entre 12-16 ms.) concomitante a la estimulación habitante. H 1, son los trazos control.

HABITUACION Y DESHABITUACION POR SUSPENSION DEL ESTIMULO
N. SURAL.

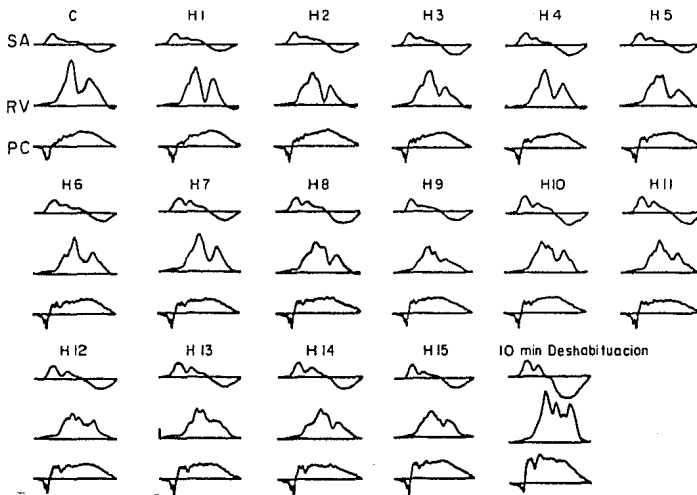


Figura 6. Se ilustra la evolución de las áreas de 8 potenciales promediados. Salva aferente (SA), reflejo de la raíz ventral S1 (RV), potencial de campo registrado en la lámina VI de Rexed, (PC). La triada marcada con C es la situación control; entre cada triada de potenciales hay un intervalo de 5 min., aunque la estimulación se dio de forma continua a una frecuencia de 0.2 Hz. Nótese la disminución progresiva del área de RV, así como la deshabitación producida por la suspensión del estímulo durante 10 min, la duración de los potenciales es de 40 ms.

Cuando se inyectó naloxona, (0.8 mg/kg. i.v.) durante el proceso de máxima habituación, se produjo una intensa deshabituación en la respuesta registrada en la raíz ventral, ver figura 5. En los casos donde se administrò naloxona, dos minutos antes de reiniciar la estimulación iterativa no se produjo la habituación, como se muestra en la figura 7, en cambio el potencial de campo registrado en la lámina VII disminuyó su amplitud, consecuentemente la integral de su area. La figura 6, ilustra los cambios que presentan la SA, RV y PC cuando previamente a la estimulación iterativa se administra naloxona (0.8 mg/kg. i.v.). No se observa disminución en el area del promedio de ocho potenciales integrados de SA y RV, en cambio PC disminuye su area progresivamente. La tabla I resume los resultados obtenidos con las respuestas de RV mediante las diversas manipulaciones experimentales.

Los resultados que se obtubieron cuando se registró el potencial de campo en las láminas IV-V durante el proceso de habituación por estimulación iterativa al nervio sural, muestran un aumento progresivo de los componentes entre 3 a 7 ms., mientras que la respuesta de la raíz ventral presentaba la mínima amplitud. La administración de naloxona (0.8 mg/kg. i.v.) acentuó el incremento especialmente de las partes tardias (~12 ms.) del PC. La figura 8, ilustra el aumento en el voltaje del PC, específicamente del componente principal situado a 3 ms., con respecto al PC control, registrado en la lámina V a los 39 min.

TABLA I

C	MH	DH	NH	NDH
100	65.0 *	116.0	114.0	120.0
100	78.4 *	159.9	100.0	117.7
100	69.7 *	87.1	131.0	92.7
100	69.9 *	116.3	189.0	
100	56.8 *	78.8	133.7	134.3

Habituaación de los potenciales de RV (las cifras están dadas en % del área bajo la curva del promedio de 8 potenciales para cada caso) producidos por estimulación del nervio sural a 0.2 Hz. En todos los casos la naloxona se administró a una dosis de 0.8 mg/kg. i.v. C, control, MH máxima habituación obtenida para cada caso, DH, deshabituaación por suspensión del estímulo (10 min.) NH, naloxona más estimulación habituante (estos valores se obtuvieron 18 min. después de la inyección de naloxona, NDH, deshabituaación bajo efecto de naloxona. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas, (análisis de varianza de Friedman de dos vías, y la prueba de muestras pariadas de Wilcoxon). $p < 0.05$ (*) se consideraron significativas para $n= 5$.

de la estimulación iterativa, la respuesta simultánea de RV muestra una disminución en el voltaje, la suspensión del estímulo por 10 min. provocó la deshabituación de la respuesta en RV (aumento del voltaje) y el PC lo disminuyó, (trazos marcados con DH).

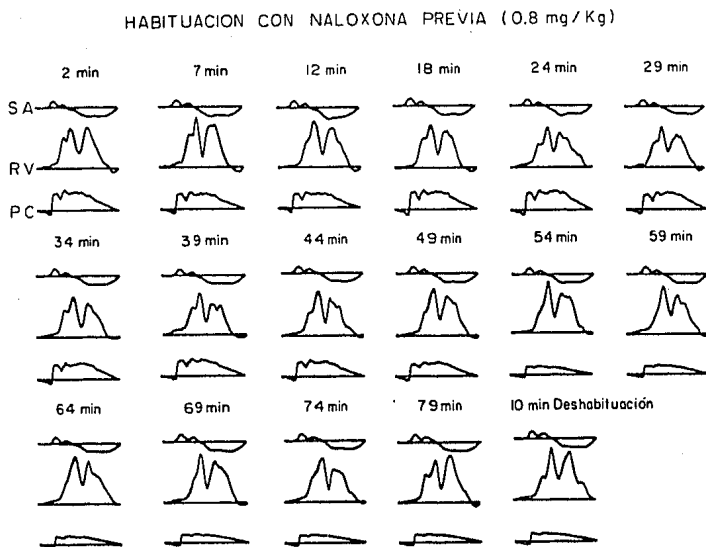


Figura 7. Se ilustran los cambios que presentan las áreas de los promedios de 8 potenciales de SA, RV y PC registrado en la lámina VI, cuando se administra naloxona (0.8 mg/kg. i.v.) 2 min. antes de iniciar la estimulación iterativa. SA y RV no presentan cambios significativos en sus áreas, PC muestra una disminución progresiva, la duración de los potenciales es de 40 ms.

HABITUACION N. SURAL 0.2 Hz

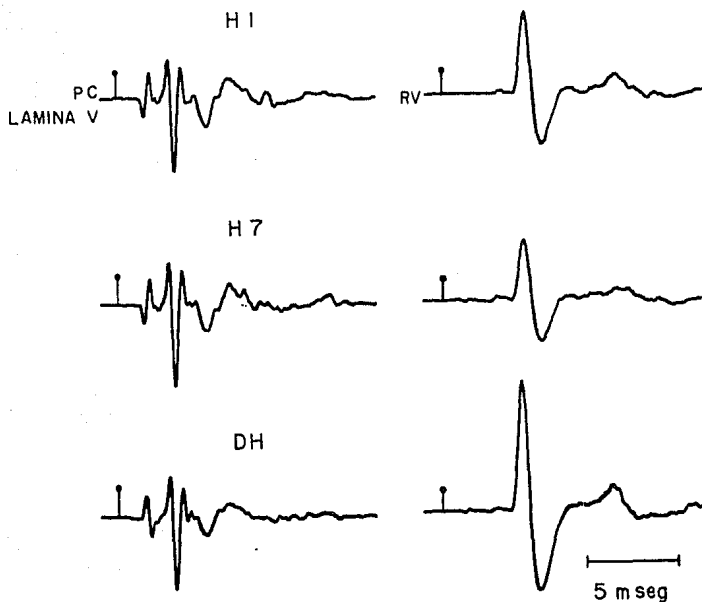


Figura 8. Se ilustran los cambios que presenta el PC, (promedio de 8), registrado en la lámina V y el potencial de RV registrado en la raíz ventral S1. H1, control, H7, trazos tomados a los 35 min. del inicio de la estimulación a 0.2 Hz. en el nervio sural, DH deshabitación por suspensión del estímulo por 10 min. Nótese el aumento en el voltaje del componente a 3 ms. del PC y la disminución del de RV. En DH el PC disminuye su voltaje, con respecto al de H7, mientras RV, muestra un aumento mayor que en el trazo control.

El registro de la actividad unitaria y multiunitaria a diversas profundidades de la sustancia gris medular y en las raíces ventrales durante la estimulación iterativa dio los siguientes resultados: La actividad unitaria registrada en las láminas IV y V presentaron un aumento progresivo en su frecuencia de disparo. Una neurona registrada en la lámina V presentó una frecuencia de disparo inicial, con la estimulación a 0.2 Hz., de \pm 64 Hz., de 80 Hz. a los 60 min y de 120 Hz. a los 125 min de estimulación iterativa; mientras que la actividad multiunitaria registrada en RV presentó \pm 130 Hz. al inicio de la estimulación, 70 Hz. a los 60 min. y 60 Hz. a los 125 min. Las deshabituciones producidas por la suspensión del estímulo, incrementó la frecuencia de disparo tanto de la neurona de la lámina V, como de la raíz ventral. Ver figura 9.

Cuando se registró la actividad unitaria en láminas profundas, (VI-VII) la disminución de la frecuencia fue similar a la habituación y la administración de la naloxona impidió la rehabilitación, ver figura 10.

Se observó el efecto de la microinyección, en la sustancia gris de la médula espinal, del agonista encefalinérgico D-Ala-2-Met-encefalina, (DAME). Este agonista difiere de la metionina encefalina endógena en que posee una D-Alanina en la posición 2, que la protege de ser inactivada rápidamente por el sistema enzimático del organismo. Se registró la actividad unitaria en la lámina V y se microinyectó por presión la DAME, 400 a 500 μ m. caudal al microelectrodo de registro. La frecuencia media durante la actividad control fue de 34 Hz., después de la microinyección,

la frecuencia descendió a ± 16 Hz., con una tendencia rápida a recuperar la frecuencia control (3 a 4 min.). Una segunda dosis fue administrada replicándose el efecto, como se muestra en la figura 11. La administración del vehiculo no causó efecto o en un

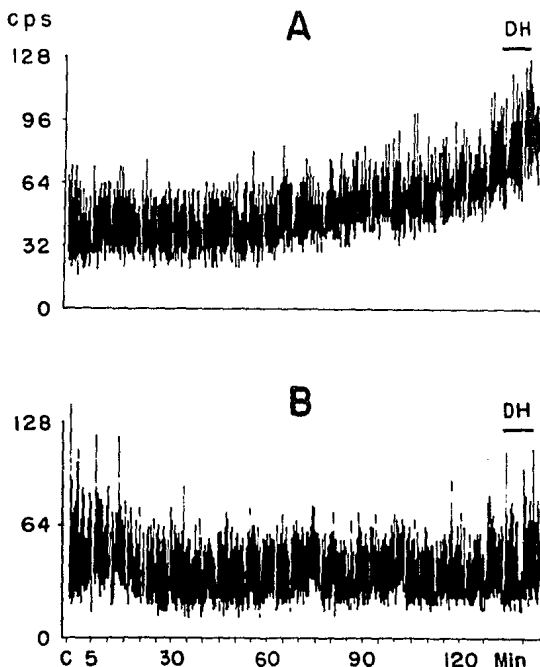


Figura 9. A, muestra la evolución de la frecuencia de la actividad unitaria (ordenadas en Hz.) de una neurona de la lámina V. B, es la evolución de la actividad multiunitaria registrada en la raíz ventral S1 del mismo experimento, durante la estimulación iterativa (0.2 Hz.) del nervio sural. A, presenta un aumento progresivo de la frecuencia, de ± 64 Hz. en el control a 120 Hz. a los 125 min., la deshabitación aumentó más la frecuencia (± 128 Hz.). B muestra una caída progresiva de la frecuencia, de ± 130 en el control a 60 Hz. a los 125 min. de la estimulación, con aumento en la frecuencia producido por la deshabitación.

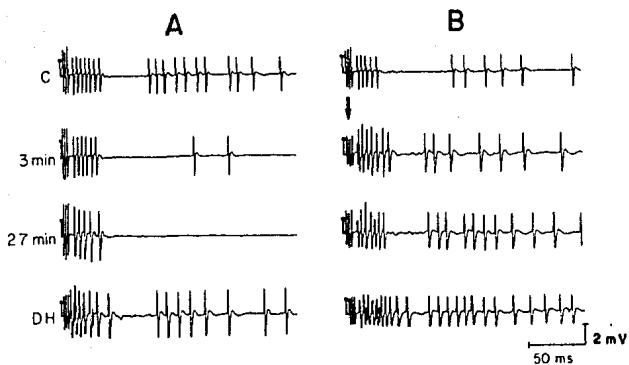


Figura 10. A, muestra el registro unitario extracelular realizado con un microelectrodo de vidrio, lleno de KCL y azul de pontamina al 4% y con una resistencia de 5-10 Mohms., de una neurona situada en la lámina VI, del primer segmento sacro de la médula espinal, durante el proceso de habituación. C, es el registro de la misma célula, a los mismos intervalos que B, después de la administración de naloxona (0.8 mg/kg i.v.), flecha. c, control, DH, deshabitación.

HABITUACION N.SURAL 0.2 Hz
Micro inyec. DALa met-enkefalina
actividad unitaria lamina V de Rexed

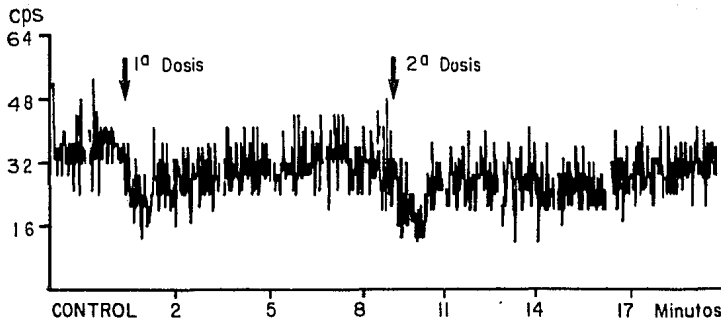


Figura 11. Se muestra la frecuencia de la actividad unitaria registrada en la lámina V. Las ordenadas representan la frecuencia en Hz. y las abscisas el tiempo en minutos. La actividad control muestra una frecuencia de ± 34 Hz. después de la microinyección del agonista encefalinérgico D-Ala-2-Met-enkefalina, (DAME) 400-500 μ m. cudad al sitio de registro, a una dosis de 1 μ g. en 250 nl. Obsérvese la disminución de la frecuencia, hasta 14 Hz. después de la administración de DAME, la segunda dosis reproduce el efecto y la frecuencia media permanece en ± 24 Hz.

caso incrementó la frecuencia basal. también se observó el efecto de la microinyección sobre la respuesta registrada en la raíz ventral, ésta al igual que la actividad de la neurona registrada en la lámina V, disminuyó su amplitud posteriormente a la administración, alcanzando una amplitud similar a la que se obtuvo con 25 min. de estimulación iterativa. La deshabitación bajo estas circunstancias fue menor que con la sola suspensión del estímulo, ver figura 12. La actividad multiunitaria registrada en la raíz S1, en otro experimento similar, mostró un patrón similar al registrado en la lámina V, es decir, se observó una disminución de la frecuencia de disparo posterior a la microinyección de la DAME, este efecto fue revertido por la administración i.v. de naloxona (0.8 mg/kg.), ver figura 13.

Los resultados inmunohistoquímicos mostraron fibras inumoreactivas a leucina-encefalina en estrecha proximidad al soma y a las prolongaciones neurales de células situadas en las láminas VII, VIII y IX del primer segmento sacro de la médula espinal del gato, ver figura 14.

Encontramos fibras inmunoreactivas en contacto con 147 células. En la lámina VII, n= 56, con cuerpos celulares de 32.7 μm . de diámetro medio, $\pm 7.3 \mu\text{m}$. En la lámina VIII, n= 31, con 38.8 μm . de diámetro medio, $\pm 13.2 \mu\text{m}$. En la lámina IX, n= 60, con 64.5 μm . de diámetro medio, ± 13.7 . En las secciones de tejido procesado por inmunofluorescencia indirecta se obtuvieron los mismos resultados.

Los criterios para considerar el contacto de las fibras con los cuerpos neuronales fueron los siguientes: i) Poder seguir el

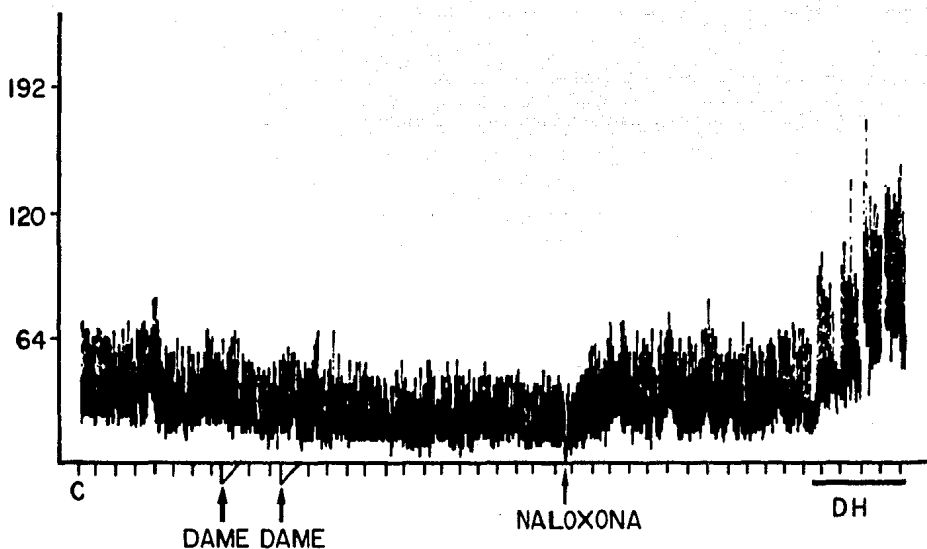
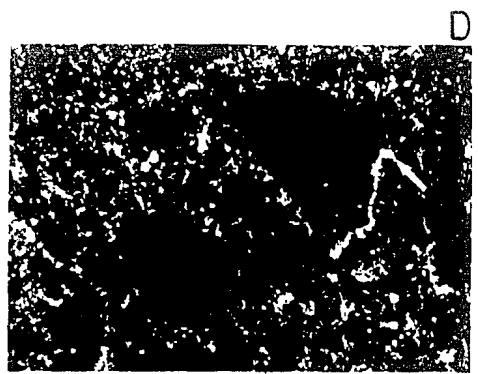
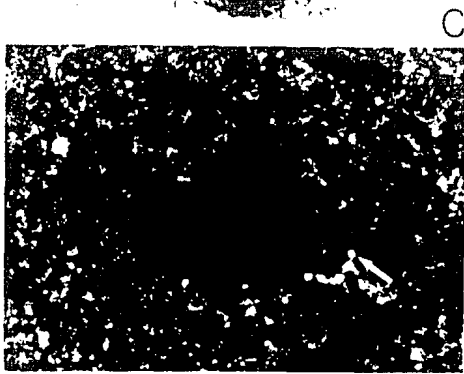
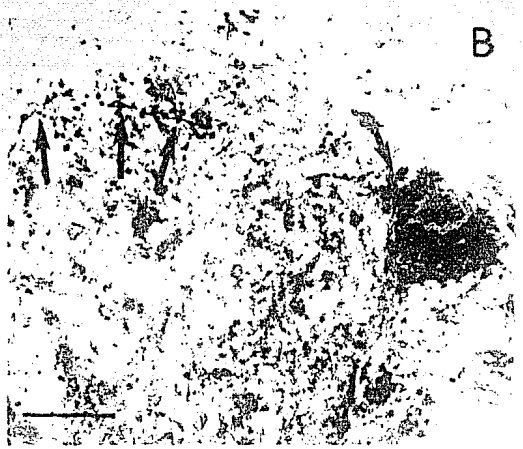


Figura 13. Se muestra la frecuencia en cps., (ordenadas) de la actividad multiunitaria registrada en la raíz ventral S1 durante la estimulación iterativa, (0.2 Hz.) al nervio sural. En las abscisas se muestra, C; la frecuencia de la actividad control, las flechas indican las administraciones de DAME, (1 $\mu\text{g}/250$ nl. microinyectada 400-500 μm . caudal a la raíz registrada y a 1500 μm . de la superficie dorsal de la médula espinal) nótese la disminución progresiva de la frecuencia y como la administración de naloxona (0.8 mg/kg, i.v.) revierte el efecto de la DAME y aumenta la frecuencia de disparo. DH es la deshabituaición producida por suspensión del estímulo por 10 min.

Figura 14. A, muestra una microfotografía a bajo aumento (32X) de una sección transversal de 25 μm . de espesor de médula espinal de gato a nivel del primer segmento sacro, procesada para inmunoreactividad a leucina-encefalina por el método de avidina-biotina-peroxidasa. Se observan algunas neuronas, en el asta ventral, (láminas VII y IX) que reciben fibras inmunoreactivas, (B, C y D); barra de calibración 500 μm . B, microfotografía de campo claro de una neurona, (lámina VII) con una fibra inmunoreactiva en proximidad al soma (flechas). C y D, microfotografía en campo oscuro de dos diferentes motoneuronas situadas en la lámina IX en contacto con fibras inmunoreactivas en una prolongación neural (C) y en el soma (D). Magnificación de B, C, y D, 312 X; barra de calibración 45 μm . E, magnificación en campo claro de C y F, ejemplo de una fibra inmunoreactiva en proximidad al soma neuronal. G, magnificación en campo claro de D. Magnificación de E, F y G, 1250 X; barra de calibración 5 μm .



DISCUSION

Hasta el momento, las características de la habituación están razonablemente entendidas, (Thompson y Spencer, 1966) y nos referimos a las características, como la forma en que el organismo responde al estímulo iterativo de baja frecuencia y los cambios de la respuesta, bioeléctrica o conductual cuando se modifican las condiciones de estimulación. La controversia existe en los mecanismos sinápticos o subsinápticos relacionados con la disminución gradual de la respuesta. Al revisar la literatura nos hemos percatado de, por lo menos, tres teorías propuestas para la explicación del fenómeno de la habituación, y en ocasiones una de éstas excluye en su totalidad a las "otras". Aunque en esta tesis nos pronunciemos por una en particular, apoyados en los resultados experimentales, no perdemos de vista que operen las demás o que coexistan, sobre todo en organismos más complejos como el mamífero; a continuación las discutiremos.

Recientemente Wood, (1988, a y b) propone como mecanismo de habituación a la contracción en el protozoario Stentor coeruleus la reducción en la amplitud del potencial en el mecanoreceptor, este autor encontró que durante la repetición del estímulo mecánico la amplitud del potencial de acción no cambia; la reducción en el potencial receptorial es voltaje dependiente, de tal manera que los canales en su forma despolarizada aumentan con respecto a los que se encuentran en la forma hiperpolarizada.

En la década de los 70, diversos investigadores, (Castellucci y col., 1970, Zucker, 1972) propusieron a la depresión

homosináptica como el mecanismo subyacente a la habituación, es decir la estimulación iterativa produce la inactivación progresiva de la conductancia al Ca^{++} sensible al voltaje, descartando toda participación del elemento postsináptico. Con el fin de precisar el mecanismo, Glanzman y Thompson (1980) analizaron la actividad espontánea de los potenciales miniatura de una vía monosináptica durante la habituación en la médula espinal de la rana y encontraron un aumento en la amplitud y en la frecuencia de los potenciales miniatura cuando la respuesta motora está habituada. Los autores proponen que sus resultados son incompatibles con la hipótesis del decremento o depleción del neurotransmisor acumulado. En contraposición, Bailey y Chen (1988) en un estudio morfológico de la presinápsis del ganglio abdominal de Aplysia reportan una reducción en la población de las vesículas listas para ser liberadas, como consecuencia de la depresión homosináptica en la habituación a corto plazo, es decir una disminución de la zona activa. La tercera hipótesis es la depresión activa; ésta propone el aumento creciente de la actividad de una interneurona inhibitoria (o grupo de ellas), que actuando sobre la vía de la habituación, serían las responsables de la disminución de la respuesta motora, (Moruzzi, 1959; Holmgren y Frank, 1961; Wickelgren, 1967). Esta hipótesis implica considerar de entrada, tanto los neurotransmisores como a la citoarquitectura de la vía en la que se produce la habituación. Nuestros resultados apoyan esta idea, el aumento, tanto en la actividad de campo, especialmente en los componentes de latencia media y larga, situados entre 5-7 ms., como en la actividad

unitaria, registrada en las láminas IV-V, concomitante a la disminución de la respuesta motora registrada en RV, (fig.9) o la misma actividad unitaria registrada en láminas más profundas (fig.10) sugieren un proceso activo, de neuronas situadas entre las láminas IV-V. Este hecho coincide con lo reportado por Wall (1980) en el sentido de que las células situadas en las láminas IV-V no se habitúan fácilmente. Nuestros resultados también apoyan lo reportado por Egger, (1978) que encontró diferencias en la localización entre las neuronas que se habitúan y las que presentan el patrón de sensibilización-habitación; estas últimas las localiza entre las láminas V-VII, de umbral intermedio y de latencia larga. Por otro lado Glazer y Basbaum, (1981) reportaron que las neuronas de la lámina V, no tan solo mandan sus axones lateralmente para formar el fascículo espino-talámico-lateral, sino que algunas mandan sus prolongaciones a láminas más profundas, lo que sustenta la posibilidad anatómica de la conexión con neuronas situadas en la parte motora.

La deshabitación se presentó siempre por la suspensión del estímulo, (fig. 5,8 y 9) llama la atención el hecho que la deshabitación ocurra con mayor amplitud y frecuencia que la actividad control, inclusive con la actividad registrada en la lámina V, esto apoya a los autores que sugieren, (Thompson y Spencer, 1966) que el mecanismo que produce la deshabitación es distinto, más adelante abundaremos en este punto relacionando a los agonistas y antagonistas endorfinérgicos.

Es relevante el hecho que la naloxona, administrada a una dosis baja (0.8 mg/kg. i.v.) interrumpa el proceso de habitación e inclusive lo impida, cuando se administra antes de iniciar la

estimulación iterativa, esto sugiere, dada la especificidad de este fármaco por los receptores a opiáceos, (Henry, 1979) que la habituación está mediada, de manera inhibitoria por células endorfinérgicas, situadas en las láminas IV-V de Rexed, más aún los componentes del PC que más aumentan su voltaje son los que se sitúan a partir de 5 ms. de latencia del estímulo, que restando el tiempo de conducción, del sitio de estímulo a la entrada de las raíces dorsales, y tomando como retraso sináptico lo reportado por Katz y Miledi, (1964), es decir 0.5 ms. por lo menos 7 sinapsis, lo que explica el aumento en estos componentes.

Chung y col. (1983), reportaron una inhibición de larga duración del reflejo de flexión en el gato, producida por estimulación a los nervios peroneo o tibial, (a-delta y fibras C) y a una frecuencia de 2 Hz. que es revertida por dosis bajas de naloxona. Reportan un incremento en el voltaje del reflejo, mayor al control por la administración de naloxona que concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis, e interpretan este incremento como una respuesta del efecto sumado de la sección espinal y la estimulación nerviosa periférica que libera opioides endógenos.

Otra prueba experimental que apoya la mediación endorfinérgica en el proceso de habituación es la disminución, en el voltaje de la respuesta de RV, después de la microinyección de DAME en la sustancia gris de la médula espinal, obteniéndose una medida similar en RV a la que se presenta con 25 min. de estimulación iterativa, (Ver figura 12) más aun, la naloxona administrada después de la microinyección de la DAME produjo un

aumento en la frecuencia de la actividad multiunitaria registrada en la raíz ventral S1, (figura 13) este hecho apoya, aún más, que el proceso de la habituación esté mediado por opioides endógenos. En estos mismos experimentos la deshabitación provocada por la suspensión del estímulo fué menor, como puede observarse en la figura 12, esto sugiere que el mecanismo de deshabitación es extrínseco a la vía de la habituación y no es endorfinérgico, ya que al estar ocupados los receptores endorfinérgicos por la DAME no se presentaría el aumento en el voltaje del potencial, ni en la actividad multiunitaria registrada en la raíz ventral durante la deshabitación.

Un punto muy importante que completa la evidencia electrofisiológica y farmacológica de la participación de neuronas endorfinérgicas en el proceso de habituación fue el obtenido de los resultados inmunohistoquímicos que mostrarón fibras reactivas a leucina-encefalina en contacto estrecho con motoneuronas de la lámina IX y con neuronas de las láminas VII y VIII, lo que sugiere una amplia modulación endorfinérgica en las respuestas motoras. En este sentido también se ha reportado por Atsumi y Sacamoto, (1987) inmunoreactividad a metionina-encefalina en terminales axónicas que hacen sinapsis con alfa motoneuronas en el pollo, esta evidencia aunada a la reportada por Glazer y Basbaum, (1981) de que los procesos de neuronas de la lámina V alcancen láminas ventrales profundas hace posible el control de respuestas motoras por estas células.

Por otro lado es bien conocido el papel del GABA como neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal (Krnjevic, 1974), recientemente se ha demostrado por varios autores (Cupello e

Hydén, 1981; Dingleline, 1981; Stewart y col., 1988) la interacción funcional entre las endorfinas y el GABA y no se descarta la posibilidad de una interacción sinérgica en el proceso de habituación de las respuestas medulares producida por estimulación iterativa de aferentes sensoriales aunque en esta tesis no están exploradas.

Nuestros resultados fisiológicos y anatomicos sugieren que los péptidos opioides están relacionados con la habituación de las respuestas aferentes sensoriales no dolorosas mediante un proceso de inhibición activa situado en las láminas IV-V y que se propaga hasta las motoneuronas.

BIBLIOGRAFIA

- Aronini, N., DiFiglia, M., Liotta, A.S., and Martin, J.B. (1981) Ultrastructural localization and biochemical features of immunoreactive leu-enkephalin in monkey dorsal horn. *Neuroscience*. 1: 561-577.
- Atsumi, S., and Sakamoto, H. (1987) Enkephalin like immunoreactive axon terminals make synapses with alpha-motoneurons in the chicken. *Brain Res.* 409: 187-192.
- Bailey, C.H., and Chen, M. (1988) Morphological basis of short-term habituation in *Aplysia*. *J.Neuroscience* 8: 2452-2459.
- Bell, J.A., and Martin, W.R. (1977) The effect of narcotic antagonists naloxone, naltrexone and nalorphine on spinal cord C-fiber reflexes evoked by electrical stimulation or radiant heat. *Eur.J.Pharmacol.* 42: 147-154.
- Buchwald, J.S., Hals, E.S., and Schramm, S. (1965) Progressive changes in efferent unit responses to repeated cutaneous stimulation in spinal cats. *Brain Res.* 28: 200-215.
- Cajal, S.R. (1910) *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des Vertevres*. Paris: Maloine, p. 986.
- Calvillo, O., Henry, J.L., and Neuman, R.S. (1974) Effects of morphine and naloxone on dorsal horn neurones in the cat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52: 1207-1211.
- Calvillo, O., Henry, J.L., and Neuman, R.S. (1979) Actions of narcotic analgesics and antagonists on spinal units responding to natural stimulation in the cat. *Can.J.Physiol. Pharmacol.* 61: 652-663.
- Carew, T., Castellucci, V.F., and Kandel, E.R. (1979) Sensitization in *Aplysia*: Restoration of transmission in synapses inactivated by long-term habituation. *Science* 205: 417-419.

- Castellucci, V.F., Carew, T.J., and Kandel, E.R. (1978) Cellular analysis of long-term habituation of the gill withdrawal reflex of *Aplysia Californica*. *Science* 202: 1306-1308.
- Castellucci, V.F., Pinsker, H., Kupfermann, F., and Kandel, E.R. (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167: 1745-1748.
- Catley, D.M., Clarke, R.W., and Pascoe, J.E. (1980) Inhibition of a reflex by activity in large-diameter cutaneous afferent fibres. *J. Physiol.* 310: 50.
- Catley, D.M., Clarke, R.W., and Pascoe, J.E. (1984) Post-tetanic depression of spinal reflexes in the rabbit and the possible involvement of opioid peptides. *J. Physiol.* 352: 483-493.
- Cervero, F., and Iggo, A. (1980) The substantia gelatinosa of the spinal cord. *Brain* 103: 717-772.
- Chung, J.M., Feng, Z.R., Cargill, C.L., and Willis, W.D. (1983) Prolonged, naloxone-reversible inhibition of the flexion reflex in the cat. *Pain* 15: 35- 53.
- Clark, D., Hughes, J., and Gasser, H.S. (1935) Afferent function in the group of nerve fibers of slowest conduction velocity. *Amer. J. Physiol.* 114: 69-76.
- Condés-Lara, M., Calvo, J.M., and Fernández-Guardiola, A. (1981) Habituation to bearable experimental pain elicited by tooth pulp electrical stimulation. *Pain* 11: 185-200.
- Coons, A.H. (1958) Fluorescent antibody methods. In J.F. Amieli (ed): *General citochemical methods*. New York: Academic Press, pp. 399-422.
- Cuello, A.C. (1987) Peptides as neuromodulators in primary sensory neurons. *Neuropharmacology* 26: 971-979.

- Cupello, A., and Hyden, H. (1981) On the presence of Met5-enkephalin receptors on the plasma membrane of Deiter's neurons and their modulation of GABA Transport. *J. Neurosci. Res.* 6: 579-583.
- DiFiglia, M., Aronin, N., and Leeman, S.E. (1982) Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of the monkey spinal cord. *Neuroscience* 7: 1127-1139.
- Dodge, R. (1923) Habituation to rotation. *J. Exp. Psychol.* 6: 1-36.
- Dingledine, R. (1981) Possible mechanisms of enkephalin action on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosciense* 1: 1022-1035.
- Egger, M.D. (1978) Sensitization and habituation of dorsal horn cells in cats. *J. Physiol.* 279: 153-166.
- Einspahr, F.J., and Piercey, M.F. (1980) Morphine depresses dorsal horn neuron responses to controlled noxious and non-noxious cutaneous stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213: 456-461.
- Farel, P.B. (1974) Dual processes control response habituation across a single synapse. *Brain Res.* 72: 323-327.
- Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M., Barragán, L.A., Alvarado, R., and Condés-Lara, M. (1982) Kindling in the spinal cord: Differential effects on mono- and polysynaptic reflexes and its modifications by atropine and naloxone. *Electroenceph. clin. Neurophysiol. Supp.* 36: 257-263.
- Fields, H.L., Emson, P.C., Leigh, B.K., Gilbert, R.F.T., and Iversen, L.L. (1980) Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibers. *Nature (Lond.)* 284: 351-353.
- Glanzman, D.L., and Thompson, R.F. (1980) Alterations in spontaneous miniature potentials activity during habituation of a vertebrate monosynaptic pathway. *Brain Res.* 189: 377-390.

- Glazer, E.J., and Basbaum, A.I. (1981) Immunohistochemical localization of leucine-enkephalin in the spinal cord of the cat: Enkephalin-containing marginal neurons and pain modulation. *J.Comp.Neurol.* 169: 377-389.
- Godfarb, J., and Hu, J.W. (1976) Enhancement of reflexes by naloxone in spinal cats. *Neuropharmacol.* 15: 785-792.
- Groves, P.M., DeMarco, R., and Thompson, R.F. (1969) Habituation and sensitization of spinal interneuron activity in acute spinal cat. *Brain Res.* 14: 521-525.
- Groves, P.M., and Thompson, R.F. (1970) Habituation: A dual-process theory. *Psychol. Rev.* 77: 419-450.
- Guzmán-Flores, F.C., Alcaráz, M., and Fernández-Guardiola, A. (1958) Rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Bol. Estud. Med. Biol. (Mexico)* 16: 29-31.
- Harris, J.D. (1943) Habitatory response decrement in the intact organism. *Psychol. Bull.* 40: 385-422.
- Henry, J.L. (1979) Naloxone excites nociceptive units in the lumbar dorsal horn of the spinal cat. *Neuroscience* 4: 1485-1491.
- Hensel, H., and Boman, K.K.A. (1960) Afferent impulses in cutaneous sensory nerves in human subjects. *J. Neurophysiol.* 23: 564-578.
- Hernández-Peón, R. (1960) Neurophysiological correlates of habituation and other manifestations of plastic inhibition (internal inhibition). In H.H. Jasper and G.D. Smirnov (eds): *The Moscow colloquium on electroencephalography of higher nervous activity.* Moscú: *Electroencep. clin. Neurophysiol., Suppl.* 13, pp. 101-114.
- Hernández-Peón, R., Guzmán-Flores, C., Alcaráz, M., and Fernández-Guardiola, A. (1958) Habituation in the visual pathway. *Act. Neurol. Lat.* 4: 121-129.
- Holmgren, B., and Frank, S. (1961) Inhibitory phenomena and habituation at the neuronal level. *Nature* 192: 1294-1295.

- Hunt, S.P., Kelly, J.S., Emson, P.C., Kimmel, J.R., Miller, R.J., and Wu, J.Y. (1981) An immunohistochemical study of neuronal population containing neuropeptides or aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. *Neuroscience* 6: 1883-1898.
- Kandel, E.R. (1977) Neuronal plasticity and the modification of behavior. In J. M. Brookhart and V.B. Mountcastle (eds): *Handbook of Physiology. The Nervous System.*: Am. Physiol.Soc., pp. 1137-1182.
- Katz, B., and Miledi, R. (1964) The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc. Roy. Soc. B*, 161: 483-495.
- King, B.C. (1926) The influence of repeated rotation on decerebrated and on blinded squabs. *J. Comp. Psychol.* 6: 399-421.
- Knott, J.R., and Henry, C.E. (1941) The conditioning of the blocking of the alpha rhythm of the human electroencephalogram. *J. Exp. Psychol.* 28: 134-144.
- Konorski, J. (1948) *Conditioned reflexes and neuron organization.* New York: Cambridge University Press.
- Krnjevic, K. (1974) Nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol.Rev.* 54: 418-440.
- LaMotte, C., Candace, B., and Solomon, H. (1976) Opiate receptor binding in primate spinal cord: Distribution and changes after dorsal root section. *Brain Res.* 112: 407-412.
- LaNerolle, N.C., and LaMotte, C. (1983) Ultrastructure of chemically defined neuron systems in the dorsal horn of the monkey. I. Substane P immunoreactivity. *Brain Res.* 274: 31-49.
- León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Martínez-Servín, M., and Pellicer, F. (1988) Demostracion inmunchistoquimica de terminales encefalinergicas sobre motoneuronas de la medula espinal del gato. Congreso Nacional de Ciencias Fisiologicas, Queretaro, Gro. XXXI: M 05.

- Martinez-Gomez, M., Pacheco, P., and Komisaruk, B.R. (1986) The rat sural nerve has no efferent somatomotor component. Soc. Neurosci. Abss. 12: 336.
- Melzak, R., and Wall, P.D. (1965) Pain mechanisms: A new theory. Science 150: 971-979.
- Miller, K.E., and Seybold, V.S. (1987) Comparison of Met-enkephalin, Dinorphin- A, and Neurotensin-immunoreactive neurons in the cat and rat spinal cords: I. lumbar cord. J. Comp. Neurol. 255: 293-304.
- Moruzzi, G. (1959). Nuovo Cimento 13 Supp 2: 532.
- Ochoa, J. (1971) The sural nerve of the human foetus: electron microscope observations and counts of axons. J. Anat. 108: 231-245.
- Pavlov, I. (1927) Conditioned reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. New York: Oxford University Press.
- Pearson, J.A., and MacDonald, J.F. (1973) Habituation of the flexor reflex: Inhibitory build-up or synaptic depression ?. Brain Res. 53: 451-454.
- Pellicer, F. (1988) Cambios plasticos en la médula espinal del gato producidos por estimulación eléctrica repetida en aferentes cutáneos y musculares. Mexico UACP y P UNAM: tesis de maestria en ciencias fisiológicas, pp. 1-69.
- Proshansky, E., and Egger, M.D. (1977) Dendritic spread of dorsal horn neurons in cat. Exp.Brain Res. 28: 153-166.
- Prosser, C.L., and Hunter, W.S. (1936) The extinction of startle responses and spinal reflexes in the white rat. Amer. J. Physiol. 117: 609-618.
- Renshaw, B. (1941) Influence of discharge of motoneurons upon excitation of neighboring motoneurons. J.Neurophysiol. 4: 167-183.

- Renshaw, B. (1946) Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots. *J. Neurophysiol.* 9: 191-204.
- Rexed, B. (1952) The citoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96: 415-466.
- Rexed, B. (1964) Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. In J.C. Eccles and J.P. Schade (eds): *Progres in Brain Research. Organization of the Spinal Cord.* Amsterdam: Elsevier, pp. 58-92.
- Ruda, M.A. (1982) Opiates and pain pathways: Demonstration of enkephalin synapses on dorsal horn projection neurons. *Science* 215: 1523-1524.
- Sánchez-Alvarez, M., León-Olea, M., Condés-Lara, M., Briones, M., and Fernández-Guardiola, A. (1988) Localization of the microelectrode tip combining a rapid procedure method and marking with pontamine sky blue. *Bol. Estud. Med. Biol. (Mexico)* 36: 55-59.
- Sar, M., Stumpf, W.E. Miller, R.J., Chang, K.J., and Cuatrecasas, P. (1979) Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 182: 17-38.
- Satoh, M., Kawajiri, S.I., Ukai, Y., and Yamamoto, M. (1979) Selective and non-selective inhibition by enkephalins and noradrenaline of nociceptive responses of lamina V type neurons in the spinal dorsal horn of the rabbit. *Brain Res.* 177: 384-387.
- Scheibel, M.E., and Scheibel, A.B. (1969) Terminal patterns in cat spinal cord. Primary afferent collaterals. *Brain Res.* 13: 417-443.
- Sharpless, S., and Jasper, H.H. (1956) habituation of the arousal reaction. *Brain.* 79: 655-680.
- Sherrington, C.S. (1906) *The integrative action of the nervous system.* New Haven: Yale University Press.
- Siegel, S. (1956) *Non parametric statistics for the behavioral sciences.* New York: McGraw-Hill.

- Snider, R.S., and Niemer, W.T. (1961) A stereotaxic atlas of the cat brain. Chicago: Chicago Press.
- Spencer, W.A., Thompson, R.F., and Neilson, D.R.J.r. (1966) Decrement of ventral root electrotonus and intracellularly recorded Epsp's produced by iterated cutaneous volleys. J. Neurophysiol, 29: 253-274.
- Stewart, A., Bergman, R.L., Wynn, M.D., Michael, D.P., and Frieda, G.R. (1988) GABA agonists enhance morphine and fentanyl antinociception in rabbit tooth pulp and mouse hot plate assays. Drug Development Research 14: 111-122.
- Thompson, R.F., and Spencer, W.A. (1966) Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. Psychol. Rev. 73: 16-43.
- Thorpe, W.H. (1956) Learning and instinct in animals. London: Methuen.
- Vindrola, O., Briones, R., Asai, M., and Fernandez-Guardiola, A. (1981) Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. Neurosci. Lett. 21: 39-43.
- Wall, P.D. (1967) The laminar organization of the dorsal horn and effects of descending impulses. J.Physiol. 188: 403-423.
- Wall, P.D. (1978) The gate control theory of pain. Mechanism a re-examination and re-estatement. Brain 101: 1-18.
- Wall, P.D. (1980) The role of substantia gelatinosa as a gate control. In J.J. Bonica (ed): Pain. New York: Raven Press, pp. 205-231.
- Wickelgren, B.G. (1967) Habituation of spinal interneurons. J. Neurophysiol. 30: 1424-1438.
- Wood, D.C. (1988a) Habituation in Stentor: A response-dependent process. J. Neuroscience 8: 2248-2253.
- Wood, D.C. (1988b) Habituation in stentor: Produced by mechanoreceptor channel modification. J.Neuroscience 8: 2254-2258.

Yaksh, T.L. (1978) Inhibition by etorphine of the discharge of dorsal horn neurones: Effects upon the neuronal response to both high- and low-threshold sensory input in the decerebrate spinal cat. *Exp.Neurol.* 60: 23-40.

Yaksh, T.L. (1981) Spinal opiate analgesia: Characteristics and principles of action. *Pain* 11: 293-346.

Yaksh, T.L., Michener, S.R., Bailey, J.E., Harty, G.J., Lucas, D.L., Nelson, D. K., Roddy, D.R., and Go, L.W. (1988) Survey of distribution of substance P, Vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin, neurotensin, met-enkephalin, bombesin and PH1 in the spinal cord of cat, sloth and monkey. *Peptides* 9: 357-372.

Yaksh, T.L., and Noueihed, R. (1985) The physiology and pharmacology of spinal opiates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 433-462.

Yaksh, T.L., and Rudy, T.A. (1978) Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain* 4: 299-359.

Zieglgansberger, W., and Tulloch, I.F. (1979) The effects of metionin- and leucine-enkephalin on spinal neurons of the cat. *Brain Res.* 167: 53-64.

Zucker, R.S. (1972) Crayfish escape behavior and central synapses.II. Physiological mechanisms underlying behavioral habituation. *J.Neurophysiol.* 35: 621-637.