



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes
mielinizadas por la activación de receptores nicotínicos en la médula
espinal del ratón”**

T E S I S

Que presenta

M.V.Z. Jesús Angel Aguirre Pineda

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Jorge Noel Quevedo Durán

Ciudad de México

AGOSTO, 2019

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante el transcurso de la maestría.

A mis padres, por el amor con el que me han guiado y acompañado a lo largo de mi vida.

Al doctor Jorge Quevedo, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio; por sus enseñanzas y contribuciones a mi formación.

A Elvia Mena y Jonathan Milla, por su orientación y consejos; a Jorge Calvo y Alejandro Carapia, por su valiosa asistencia a lo largo de este trabajo.

A los doctores José Antonio Arias y Rodolfo Delgado, por su asesoría y recomendaciones.

A mis compañeros de generación y profesores, por sus aportaciones; por todas las experiencias que hemos compartido.

A Virgilio Green, por su apoyo, paciencia y afecto.

Índice

1. Resumen	8
Abstract	9
2. Introducción	10
2.1. Modulación de la información sensorial.....	12
2.1.1. Desarrollo del concepto de inhibición presináptica.....	14
2.1.2. Inhibición presináptica asociada a PAD e inhibición presináptica no asociada a PAD.....	15
2.2. Despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD).....	17
2.2.1. Mecanismos clásicos de generación de la PAD.....	18
2.2.2. Modo de acción de la PAD.....	20
2.2.3. Control de diferentes ramas de una misma fibra aferente.	21
2.2.4. Potenciales de raíz dorsal (DRPs).....	22
2.2.5. Reflejos de raíz dorsal (DRRs).....	22
2.2.6. PAD producida por la estimulación de fibras aferentes	23
2.3. Mecanismos no clásicos de inhibición presináptica y PAD.....	24
2.3.1. Activación de receptores GABA _A extrasinápticos.....	24
2.3.2. Posible participación de otros transmisores y receptores..	25
2.3.3. Posible producción de PAD mediante vías más directas...	27
2.4. Modulación de la transmisión sináptica por los nAChRs.....	30
2.4.1. Interneuronas colinérgicas del asta dorsal.....	31
2.4.2. Liberación de ACh por las fibras aferentes primarias.....	32
2.4.3. Liberación de ACh por fibras descendentes.....	35
2.4.4. ACh procedente de otras fuentes.....	36
3. Planteamiento del problema y objetivos	38
4. Métodos	40
4.1. Preparación de la médula espinal <i>in vitro</i>	40
4.2. Estimulación y registro.....	40
4.3. Protocolo para determinar las depresiones homosináptica y heterosináptica.....	42

4.4. Técnica de Wall.....	43
4.5. Control de corriente y voltaje en la configuración de célula entera.....	44
4.6. Fármacos.....	44
5. Resultados.....	46
5.1. EFPs y DRPs evocados por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral.....	46
5.2. EFPs y DRPs evocados por la estimulación del nervio tibial a diferentes intensidades.....	47
5.3. Efecto de la ACh y la nicotina en los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral.....	48
5.4. Potencia de la ACh y la nicotina en la depresión de los EFPs y DRPs.....	52
5.5. Efecto de la ACh y la nicotina en el potencial DC y la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral.....	55
5.6. Efecto de la nicotina en la depresión homosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas.....	56
5.7. Efecto de la nicotina en la depresión heterosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes heterónimas.....	60
5.8. Efecto de la nicotina en las corrientes monosinápticas excitadoras (EPSCs) producidas en neuronas del asta dorsal por la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas.....	62
5.9. Efecto de la nicotina en las propiedades pasivas de las neuronas del asta dorsal.....	64
6. Discusión.....	66
7. Conclusiones.....	74
Perspectivas a largo plazo.....	74
8. Referencias.....	76

Lista de abreviaturas

[K⁺]_e = concentración extracelular de K⁺
ACh = acetilcolina
cChAT = acetiltransferasa de colina de tipo común
ChAT = acetiltransferasa de colina
DRP = potencial de raíz dorsal
DRR = reflejo de raíz dorsal
EFP = potencial extracelular de campo
EPSC = corriente postsináptica excitadora
EPSP = potencial postsináptico excitador
GABA = ácido γ-aminobutírico
GPCR = receptor acoplado a proteína G
GRD = ganglios de raíz dorsal
IC₅₀ = concentración inhibitoria media máxima
IEE = intervalo de tiempo entre estímulos
LCR = líquido cefalorraquídeo
mAChR = receptor a acetilcolina muscarínico
nAChR = receptor a acetilcolina nicotínico
PAC = potencial de acción compuesto
PAD = despolarización de fibras aferentes primarias
pChAT = acetiltransferasa de colina de tipo periférico
RD = raíz dorsal
SNC = sistema nervioso central
TTX = tetrodotoxina
VACHT = transportador vesicular de acetilcolina
xU = veces el valor umbral

1. Resumen

La médula espinal es un centro de integración importante, en el que diversos procesos moduladores permiten la adecuada interpretación de los cambios en el entorno por parte del sistema nervioso. Uno de los principales mecanismos moduladores de la información sensorial es la despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD), que es producida por la activación de receptores GABA_A presinápticos. Investigaciones recientes, no obstante, han sugerido que otros receptores también podrían estar implicados en la generación o modulación de la PAD, particularmente los receptores a acetilcolina nicotínicos (nAChRs). En el presente trabajo nos hemos propuesto investigar el papel de la ACh y los nAChRs en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas y en las vías neuronales que producen la PAD, utilizando como modelo la médula espinal *in vitro* del ratón. Encontramos que la ACh y la nicotina deprimen los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la activación de las fibras aferentes mielinizadas, sugiriendo una disminución de la transmisión sináptica de dichas fibras y una reducción en la excitabilidad de las interneuronas que median la PAD. Ambas drogas indujeron una despolarización sostenida de las fibras aferentes registrada como un cambio negativo en el potencial DC a nivel de la raíz dorsal (RD) L₄, pero sin aumentar la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC) evocado por la microestimulación intraespinal. La nicotina no afectó la depresión homosináptica de los EFPs producidos por la estimulación de fibras aferentes homónimas, ni la depresión heterosináptica de los EFPs producidos por la estimulación de fibras aferentes heterónimas. Tampoco modificó las propiedades pasivas de las neuronas registradas en el asta dorsal, indicando que no se produce una modulación de nAChRs localizados en las interneuronas que generan la PAD. En conjunto, estos resultados sugieren que la ACh inhibe la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas mediante la activación de nAChRs presinápticos, posiblemente a través de un cortocircuito y/o una inactivación de los canales iónicos involucrados en la propagación del potencial de acción.

Abstract

The spinal cord is an important center of sensory and motor integration. Several modulatory processes of sensory information allow the proper interpretation of changes in the environment by the nervous system. One particular mechanism for modulation of sensory information is presynaptic inhibition (PSI) associated with primary afferent depolarization (PAD), which is produced by the activation of presynaptic GABA_A receptors. Recent studies, however, suggest that other receptors may also be involved in the generation of PSI, particularly nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). In the present work we have proposed to investigate the role of ACh and nAChRs in modulating the synaptic transmission of myelinated afferent fibers and in the neuronal pathways mediating PAD. To this end, we used the *in vitro* model of the mouse spinal cord. We found that ACh and nicotine depress the extracellular field potentials (EFPs) and dorsal root potentials (DRPs) produced by the activation of myelinated afferent fibers, suggesting a decrease in the synaptic transmission of these fibers and a possible excitability decrease of interneurons mediating PAD. Both drugs also induced a sustained depolarization of afferent fibers recorded as a negative change in the DC potential at the level of the dorsal root (DR) L₄, but without producing an increase in the amplitude of the compound action potential (CAP) evoked by intraspinal microstimulation. In addition, nicotine did not affect the homosynaptic depression of EFPs produced by the stimulation of homonymous afferents, or the heterosynaptic depression of EFPs evoked by stimulation of heteronymous afferents. Finally, nicotine did not modify the passive properties of neurons recorded in the dorsal horn, indicating that there is no modulation of nAChRs located in the interneurons that generate PAD. Taken together, these results suggest that ACh inhibits synaptic transmission of myelinated afferent fibers by activating presynaptic nAChRs, possibly through a membrane shunting and/or an inactivation of ion channels involved in the propagation of action potentials.

2. Introducción

El sistema nervioso central (SNC) recibe e integra continuamente una gran cantidad de información sensorial procedente de la periferia del cuerpo. La información sensorial *somática* se origina en receptores que están distribuidos por todo el organismo y que son sensibles a cambios en la posición de los músculos y las articulaciones, la presión ejercida por objetos sobre la piel, la temperatura de diferentes regiones del cuerpo, u a otros estímulos diversos. La función fundamental de estos receptores es traducir diferentes formas de energía (por ejemplo, mecánica, térmica o química) en impulsos que pueden ser interpretados por el sistema nervioso. Dichos impulsos son conducidos de los órganos sensoriales al SNC por medio de las fibras sensoriales o fibras aferentes primarias (**figura 1**).

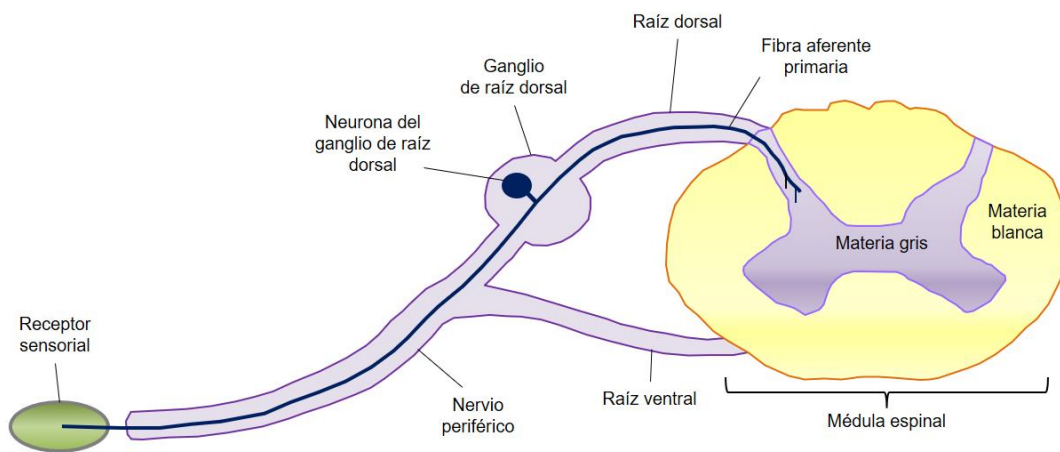


FIGURA 1. Las fibras aferentes primarias conducen información de los receptores sensoriales a la médula espinal. Las fibras aferentes primarias, que emergen de las neuronas de los ganglios de raíz dorsal (GRD), conducen potenciales de acción de los órganos sensoriales al SNC.

Las fibras sensoriales que se originan en la piel y los músculos de los mamíferos se han dividido de manera general en dos grupos: de bajo umbral

y de alto umbral (**cuadro 1**) (Bear et al., 2007; Gardner y Johnson, 2013). Las primeras tienen un mayor diámetro, están mielinizadas, presentan una mayor velocidad de conducción y requieren estímulos eléctricos de menor intensidad para su activación; entre ellas se encuentran las de los grupos I y II procedentes de los músculos y las cutáneas A β , que transmiten información no nociceptiva. En cambio, las fibras de alto umbral tienen un menor diámetro, y pueden presentar una capa delgada de mielina o no estar mielinizadas; esta segunda categoría incluye a las fibras de los grupos III y IV procedentes de los músculos y a las A δ y C cutáneas. Todos estos tipos de fibras se encuentran en los nervios periféricos y llegan a la médula espinal a través de las raíces dorsales (RDs).

	FIBRAS DE BAJO UMBRAL		FIBRAS DE ALTO UMBRAL	
Axones procedentes de la piel		Aβ	Aδ	C
Axones procedentes de los músculos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Diámetro (μm)	12-20	6-12	1-6	0.2-1.5
Velocidad de conducción (m/s)	72-120	35-75	4-36	0.4-2
Receptores sensoriales	Propioceptores del músculo esquelético	Mecanorreceptores en la piel	Nociceptores y termorreceptores	Nociceptores y termorreceptores

CUADRO 1. Clasificación de las fibras aferentes primarias en el sistema somatosensorial de los mamíferos

Aunque las terminaciones intraespinales de las fibras aferentes primarias presentan una distribución muy compleja, existen algunos patrones anatómicos generales que conviene mencionar. Por ejemplo, las fibras mielinizadas de mayor diámetro, como las del grupo I procedentes de los músculos, terminan en el núcleo intermedio y en el asta ventral (**figura 2**). Por su parte, las fibras mielinizadas A β , procedentes de los mecanorreceptores

cutáneos, proyectan hacia las regiones profundas del asta dorsal, a las dendritas de las neuronas de las láminas III-V de Rexed. Por otro lado, las fibras A δ y C, que conducen información nociceptiva y térmica, establecen sinapsis con neuronas de las regiones superficiales del asta dorsal, en las láminas I-II. Estas consideraciones anatómicas pueden resultar útiles para el estudio selectivo de la transmisión sináptica de determinados tipos de fibras aferentes.

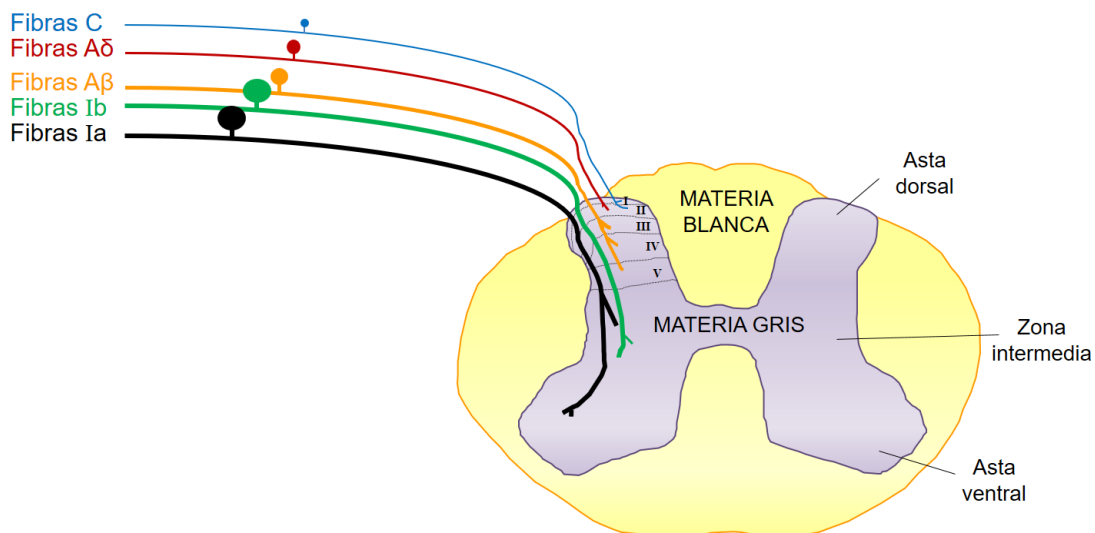


FIGURA 2. Las terminaciones de las fibras aferentes primarias se proyectan hacia diferentes regiones de la materia gris de la médula espinal. En un corte transversal de la médula espinal, la materia gris presenta una distribución en forma de “mariposa”, y está conformada por las astas dorsales y ventrales, así como por la región intermedia. Los distintos tipos de fibras aferentes primarias, como las Ia (procedentes de los husos musculares), las Ib (procedentes de los órganos tendinosos de Golgi), las A β (procedentes de los mecanorreceptores cutáneos) y las A δ y C cutáneas (que conducen información nociceptiva y térmica), proyectan sus terminaciones hacia diferentes regiones de la materia gris.

2.1. Modulación de la información sensorial

La médula espinal está expuesta continuamente a una cantidad enorme de impulsos aferentes, pero no toda esta información es igualmente relevante. La selección de la información importante es fundamental para la interpreta-

ción adecuada de los cambios en el entorno por parte del SNC. Ciertamente, la información que llega a la médula espinal a través de las fibras aferentes primarias está sujeta a una amplia gama de mecanismos moduladores, por lo que puede ser suprimida, facilitada o dirigida selectivamente.

Los mecanismos espinales que modulan la información sensorial pueden clasificarse como presinápticos o postsinápticos, dependiendo del sitio en el que influyen sobre la transmisión sináptica. Por ejemplo, hay una modulación *postsináptica* mediada por contactos localizados sobre el soma y las dendritas de las neuronas de la médula espinal; asimismo, existe modulación *presináptica* a través de contactos axoaxónicos establecidos sobre las terminaciones de las fibras aferentes primarias (**figura 3**). Estos dos tipos de modulación tienen implicaciones funcionales distintas: las sinapsis axosomáticas/axodendríticas, que producen una modulación postsináptica, afectan la actividad de *todas* las ramificaciones del axón de la neurona postsináptica, ya que influyen sobre la probabilidad de que dicha neurona genere potenciales de acción. En cambio, las sinapsis axoaxónicas, que producen una modulación presináptica, pueden regular la actividad de terminaciones axónicas *específicas*.

En relación con la supresión de la actividad aferente irrelevante, parecen más convenientes aquellos mecanismos que actúan en los sitios más iniciales posibles, antes de que la actividad sensorial no deseada haya producido alteraciones considerables en el SNC. En el sistema somatosensorial de los vertebrados, la inhibición presináptica ejercida sobre las terminaciones intraespinales de las fibras aferentes primarias resulta un mecanismo muy adecuado para tal propósito: ofrece la ventaja de suprimir el flujo de información en algunas, pero no en todas las terminaciones de una misma fibra aferente. Esto permite dirigir la información sensorial hacia neuronas centrales específicas, según las necesidades fisiológicas del organismo.

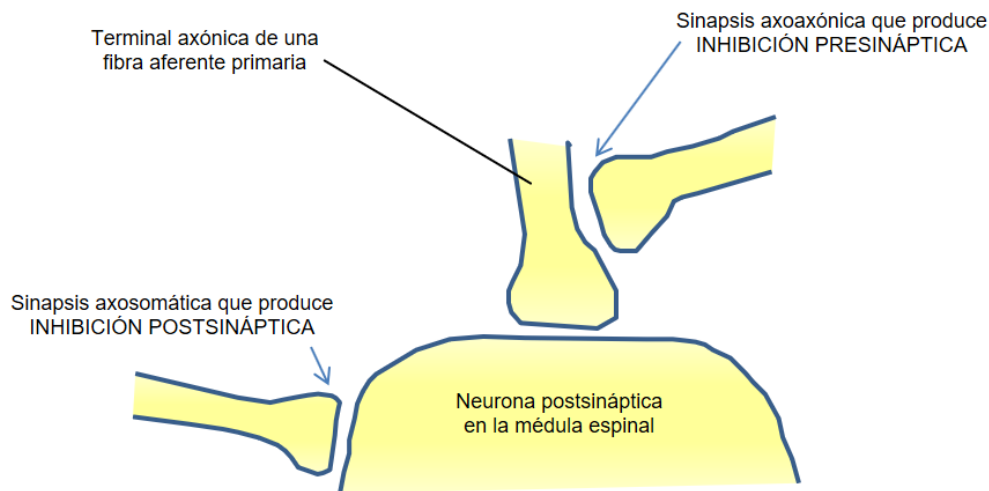


FIGURA 3. La inhibición postsináptica y la inhibición presináptica son mecanismos moduladores distintos. La inhibición postsináptica está mediada por contactos axosomáticos o axodendríticos establecidos sobre el elemento postsináptico (que puede ser, por ejemplo, una motoneurona o una interneurona de la médula espinal). En cambio, la inhibición presináptica está mediada por contactos axoaxónicos establecidos sobre el elemento presináptico (que puede ser, por ejemplo, una de las terminaciones intraespinales de una fibra aferente primaria).

2.1.1. Desarrollo del concepto de inhibición presináptica

Las terminaciones intraespinales de las fibras aferentes primarias, como blanco de la inhibición presináptica, constituyen el primer sitio de control central de la actividad aferente y, por lo tanto, un punto crítico para la regulación de la información sensorial. Para estudiar la modulación de la transmisión sináptica entre las fibras aferentes primarias y sus neuronas blanco, es necesaria una comprensión clara de los mecanismos básicos implicados en la generación de la inhibición presináptica. Por tal motivo, en los siguientes párrafos se describe brevemente el desarrollo del concepto de inhibición presináptica, así como los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a este fenómeno. Para un abordaje más profundo sobre la

inhibición presináptica se recomienda consultar las revisiones de Schmidt (1971), Rudomin y Schmidt (1999) y Engelman y MacDermott (2004).

El concepto de inhibición presináptica comenzó a desarrollarse hacia finales de la década de los 50 y principios de la década de los 60, cuando se describió una depresión de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) que ocurría en ausencia de cambios detectables en la excitabilidad de las neuronas postsinápticas, o en el curso temporal de los EPSPs (Frank y Fourtes, 1957; Schmidt, 1971; Rudomin y Schmidt, 1999). Uno de los avances más importantes de esa misma época consistió en relacionar la inhibición presináptica con una despolarización de las terminaciones de las fibras aferentes primarias (Eccles et al., 1961; Eccles et al., 1962). Esta despolarización, denominada PAD (por su nombre en inglés: *primary afferent depolarization*), provoca paradójicamente una disminución de la liberación de neurotransmisor. Como se revisa más adelante, dicho efecto se debe a una reducción de la amplitud de los potenciales de acción, o a un bloqueo en la conducción de los mismos, con la consecuente disminución o supresión de la entrada de Ca^{2+} a las terminaciones de las fibras aferentes primarias. La PAD es, por lo tanto, un mecanismo por el que se produce inhibición presináptica.

2.1.2. Inhibición presináptica asociada a PAD e inhibición presináptica no asociada a PAD

Desde los primeros años de investigación en el tema, numerosas observaciones llevaron al reconocimiento de la PAD como una forma importante de inhibición presináptica (la PAD se aborda en la sección 2.2). Sin embargo, también existe una inhibición producida en las terminaciones de las fibras aferentes primarias en ausencia de despolarización, por lo que los diversos mecanismos de inhibición presináptica se han dividido actualmente en dos grupos: asociados y no asociados a la PAD. Algunos ejemplos de estos últimos se mencionan a continuación.

La inhibición presináptica no asociada a la PAD puede producirse mediante la activación de receptores metabotrópicos. Un ejemplo son los receptores GABA_B, cuya estimulación, en diferentes especies, ha mostrado inhibir la transmisión sináptica de las fibras procedentes de los husos musculares sin afectar el curso temporal de los EPSPs o la conducción de los potenciales de acción en las fibras sensoriales (Lev-Tov et al., 1988; Peng y Frank, 1989; Jiménez et al., 1991). De acuerdo con observaciones efectuadas en la rata, la activación de receptores GABA_B presinápticos también inhibe la liberación de neurotransmisor por parte de las terminaciones de las fibras A β (figura 4) (Salio et al., 2017) y A δ /C (Ataka et al., 2000), sugiriendo, respectivamente, una modulación presináptica de la información táctil y la nociceptiva. Por lo tanto, los receptores GABA_B están involucrados en la inhibición de la transmisión sináptica de diferentes tipos de fibras aferentes mediante acciones ejercidas de manera presináptica.

Las acciones moduladoras de los receptores GABA_B se deben a que su activación resulta en una inhibición de los canales de Ca²⁺ presinápticos dependientes de voltaje (Désarmenien et al., 1984; Huang et al., 2015), lo que interfiere con la entrada de Ca²⁺ y el mecanismo de liberación de neurotransmisor en las terminaciones intraespinales de las fibras sensoriales. Esta regulación de los canales de Ca²⁺ presinápticos ocurre mediante la intervención de efectores intracelulares vía activación de proteínas G.

Además de los receptores GABA_B, otros receptores metabotrópicos han sido asociados con la inhibición presináptica de las fibras aferentes primarias, particularmente en relación con la modulación de la información nociceptiva. Por ejemplo, se ha mostrado que la transmisión sináptica en las regiones superficiales del asta dorsal de la médula espinal de la rata se inhibe mediante acciones presinápticas de los receptores a opioides δ y μ (Hori et al., 1992; Glaum et al., 1994; Kohno et al., 1999), los adrenoreceptores α_2 (Kawasaki et al., 2003) y los receptores a dopamina de la familia D₂ (Lu et al., 2018). Sin embargo, la participación de los receptores metabotrópicos en la modulación

de la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral ha recibido comparativamente menos atención.

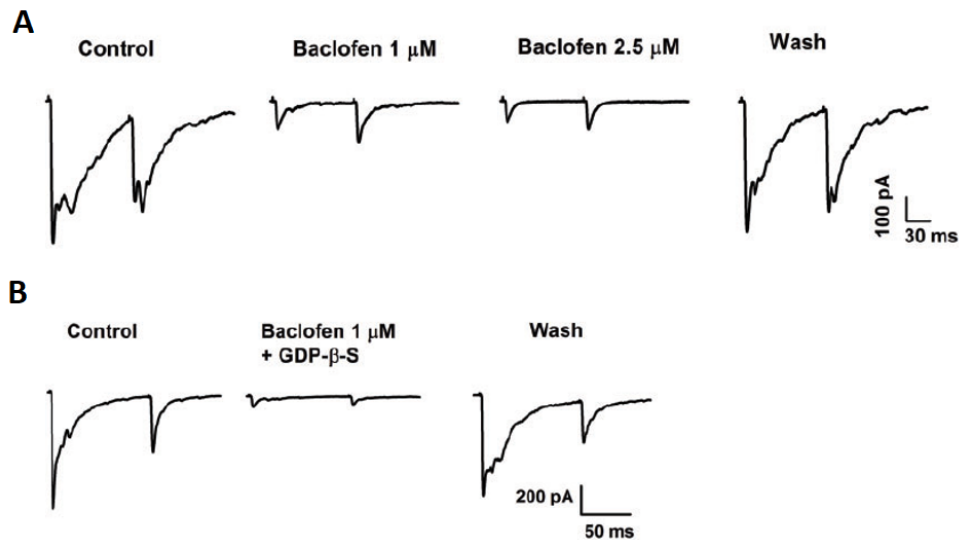


FIGURA 4. La activación de receptores $GABA_B$ presinápticos deprime las EPSCs registradas en las neuronas de las láminas III/IV. A. El baclofen (un agonista de receptores $GABA_B$), a concentraciones de $1 \mu M$ o $2.5 \mu M$, deprime las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs) evocadas por la estimulación de las fibras $A\beta$ y registradas en una neurona de las regiones profundas del asta dorsal de la médula espinal de la rata. **B.** La perfusión intracelular de la neurona con $GDP-\beta-S$ (un inhibidor de la función de las proteínas G) no evita el efecto depresor del baclofen sobre las EPSCs evocadas, excluyendo así la contribución de receptores $GABA_B$ postsinápticos, lo cual indica que el efecto del baclofen ocurre a nivel presináptico (Salio et al., 2017).

2.2. Despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD)

Como se ha mencionado, la despolarización de las terminaciones de las fibras aferentes primarias (PAD) es un mecanismo importante de inhibición presináptica que provoca disminución de la liberación de neurotransmisor al interferir con la generación o propagación de los potenciales de acción en las terminaciones de las fibras sensoriales. En el siguiente apartado se discuten

los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la PAD y sus acciones inhibitoras, así como algunas implicaciones fisiológicas de esta modulación.

2.2.1. Mecanismos clásicos de generación de la PAD

Durante años, los neurofisiólogos han discutido los mecanismos que producen PAD. De acuerdo con el modelo actual, basado en una gran cantidad de hallazgos anatómicos y farmacológicos, la PAD es generada mediante la acción de terminaciones GABAérgicas que establecen sinapsis con las terminaciones intraespinales de las fibras aferentes primarias (sinapsis axoaxónicas), proceso en el que están implicados los receptores ionotrópicos GABA_A. Aunque también existen reportes de PAD producida mediante otros mecanismos, las sinapsis axoaxónicas GABAérgicas y los receptores GABA_A mantienen vigencia como modelo clásico de generación de la PAD. A continuación, se presentan algunos de los principales trabajos publicados en el contexto de la discusión sobre los mecanismos generadores de la PAD.

Una de las propuestas iniciales para explicar la despolarización de las terminales de las fibras aferentes primarias fue el aumento de la concentración extracelular de iones K⁺ ([K⁺]_e) en la médula espinal, el cual, en efecto, puede presentarse como consecuencia de una actividad neuronal incrementada (Kříz et al., 1974). Sin embargo, en el modelo del gato se observó que la estimulación de las fibras del grupo I procedentes de los músculos flexores produce PAD en las fibras Ia procedentes de los músculos extensores en ausencia de un aumento significativo de la [K⁺]_e en la médula espinal (Jiménez et al., 1983). Además, la estimulación eléctrica de determinados nervios o tractos descendentes produce PAD en las fibras aferentes cutáneas sin que existan cambios correspondientes en la [K⁺]_e (Jiménez et al., 1987). Aunque estas observaciones no descartan una contribución de la acumulación extracelular de K⁺ a la despolarización de las fibras aferentes primarias en determinadas situaciones, es evidente que la PAD se produce mediante otros mecanismos.

La PAD es producida mediante la acción de contactos axoaxónicos GABAérgicos establecidos sobre las terminaciones de las fibras aferentes primarias. Por ello, las sinapsis axoaxónicas son consideradas el sustrato histológico fundamental de la inhibición presináptica (Alvarez, 1998). La existencia de estas sinapsis fue especulada hace más de cincuenta años y actualmente se cuenta con descripciones anatómicas de contactos axoaxónicos establecidos sobre las terminaciones de las fibras aferentes del grupo Ia (Fyffe y Light, 1984; Pierce y Mendell, 1993; Destombes et al., 1996; Watson y Bazzaz, 2001; Hughes et al., 2005), del grupo Ib (Lamotte d'Incamps et al., 1998), del grupo II (Maxwell y Riddell, 1999) y cutáneas de bajo umbral (Maxwell et al., 1995). Muchos de estos trabajos, además, han puesto de manifiesto la naturaleza GABAérgica de dichas sinapsis. Así, el concepto de que la PAD es producida mediante la acción de contactos axoaxónicos GABAérgicos localizados sobre las terminaciones de las fibras aferentes primarias está sustentado en una gran cantidad de hallazgos histológicos.

Las observaciones farmacológicas también han contribuido a dilucidar los mecanismos de generación de la PAD. Desde los años pioneros en la investigación sobre el tema, se reportó que la PAD y la inhibición presináptica se reducen con la administración de bloqueadores o antagonistas de los receptores GABA_A (Eccles et al., 1963; Schmidt, 1963; Davidoff, 1972). Estos descubrimientos indicaron que la PAD es generada mediante mecanismos que involucran la activación de los receptores de tipo GABA_A.

La **figura 5** resume de manera esquemática la generación de PAD mediante la acción de una sinapsis axoaxónica GABAérgica. La activación de los receptores GABA_A (que son canales de Cl⁻ localizados en las terminaciones de las fibras aferentes) produce una despolarización porque el gradiente electroquímico en este sitio favorece la salida de Cl⁻. Dicho gradiente se mantiene debido a que las neuronas de los GRD expresan un cotransportador Na⁺-K⁺-Cl⁻ que introduce Cl⁻ de manera activa (Alvarez-Leefmans et al., 1988; Alvarez-Leefmans, 1990; Alvarez-Leefmans et al., 1998). Aunque la actividad

de este cotransportador implica la entrada de una cantidad considerable de Na^+ , este último es expulsado rápidamente de la célula por la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$, la cual utiliza energía obtenida por la hidrólisis del ATP.

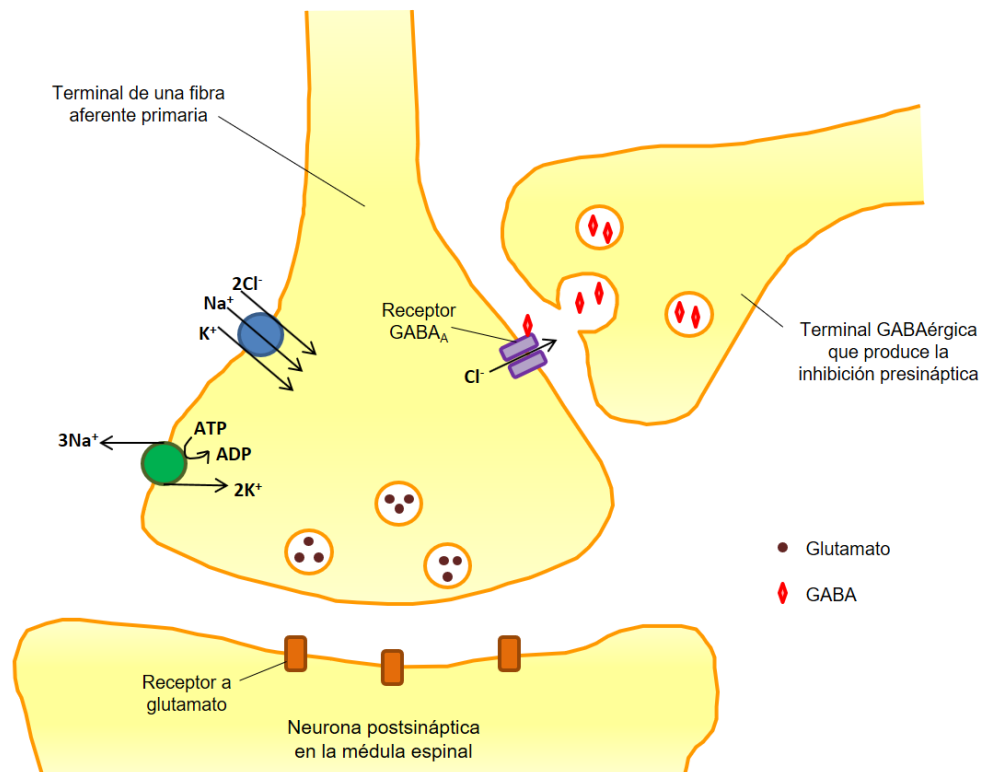


FIGURA 5. La PAD es producida por acción de las sinapsis axoaxónicas GABAérgicas.

La activación de los receptores GABA_A presinápticos da lugar a la PAD porque en las neuronas de los GRD el gradiente electroquímico favorece la salida de Cl^- . El cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ mantiene dicho gradiente mediante un mecanismo de transporte activo secundario dependiente de Na^+ .

2.2.2. Modo de acción de la PAD

La PAD disminuye la liberación de neurotransmisor (que en general es glutamato) debido a un bloqueo de la invasión de los potenciales de acción a las terminaciones de las fibras aferentes primarias, o bien a una disminución en la amplitud de los potenciales de acción propagados. En cualquier caso, el

resultado es una interferencia con la entrada de Ca^{2+} a las terminaciones, lo que tiene como consecuencia una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado.

La disminución en la amplitud de los potenciales de acción, o el bloqueo en la conducción de los mismos, pueden explicarse de diferentes maneras. Una hipótesis plantea que la despolarización da lugar a una inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, quedando menos canales disponibles para la generación de los potenciales de acción. De manera alternativa, un cortocircuito o “*shunting*” debido a una disminución de la resistencia de membrana podría interferir con los potenciales de acción. Aunque hay evidencia que sugiere una participación primordial del cortocircuito de membrana en animales invertebrados (Cattaert y El Manira, 1999), otros hallazgos en las terminaciones nerviosas de la porción posterior de la hipófisis de la rata indican que el cortocircuito tiene una contribución menor (Zhang y Jackson, 1995). Con todo, hace falta información obtenida directamente de las terminaciones de las fibras aferentes.

2.2.3. Control de diferentes ramas de una misma fibra aferente

Las diferentes ramas de una misma fibra aferente pueden ser moduladas de manera independiente. Walmsley et al. (1987) encontraron que únicamente una baja proporción de los botones derivados de las fibras Ia que llegan a la columna de Clarke en la médula espinal del gato reciben contactos presinápticos, lo cual contrasta con el alto porcentaje de botones Ia que reciben contactos axoaxónicos en el asta ventral, según reportaron Pierce y Mendell (1993). Tales desigualdades podrían reflejar diferencias en el control de la transmisión sináptica de las fibras aferentes Ia entre estas dos regiones de la médula espinal. Por otro lado, utilizando el modelo del gato, el grupo de Rudomín ha demostrado que la estimulación eléctrica de determinados nervios periféricos, o de ciertas regiones supraespinales, es capaz de modular selectivamente la eficacia sináptica o la PAD de las distintas colaterales

procedentes de una misma fibra aferente (Eguibar et al., 1994; Rudomin et al., 2004). Evidentemente, las ramificaciones intraespinales de un axón sensorial distan mucho de ser rutas fijas para la conducción uniforme de información; más bien, constituyen un sistema dinámico en el que la información procedente de una misma fuente puede ser disociada y dirigida hacia grupos específicos de neuronas blanco dentro del SNC. En animales invertebrados, no obstante, se ha documentado que la PAD puede ejercer sus acciones inhibitoras sobre el axón principal de una neurona sensorial (Cattaert y El Manira, 1999). Este hallazgo interesante implicaría que la PAD inhibe la transmisión de todas las salidas sinápticas de ese axón, sin el control selectivo descrito anteriormente.

2.2.4. Potenciales de raíz dorsal (DRPs)

La PAD producida simultáneamente en varias fibras sensoriales puede ser registrada como un potencial de raíz dorsal (DRP, por su nombre en inglés: *dorsal root potential*) debido a su conducción pasiva y retrógrada hacia las RDs (figura 6). El registro y el análisis de los DRPs es, por lo tanto, una manera indirecta de estudiar la PAD.

2.2.5. Reflejos de raíz dorsal (DRRs)

Cuando varios impulsos aferentes llegan a la médula espinal de manera sincronizada (como ocurre cuando los nervios periféricos son estimulados eléctricamente), suele producirse una PAD de magnitud suficiente para alcanzar el umbral de activación de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, lo que desencadena potenciales de acción que se conducen de manera antidrómica hacia las RDs y los nervios periféricos. Estos potenciales de acción se conocen como reflejos de raíz dorsal (DRRs, por su nombre en inglés: *dorsal root reflexes*) y pueden ser registrados periféricamente, en los nervios cutáneos y musculares.

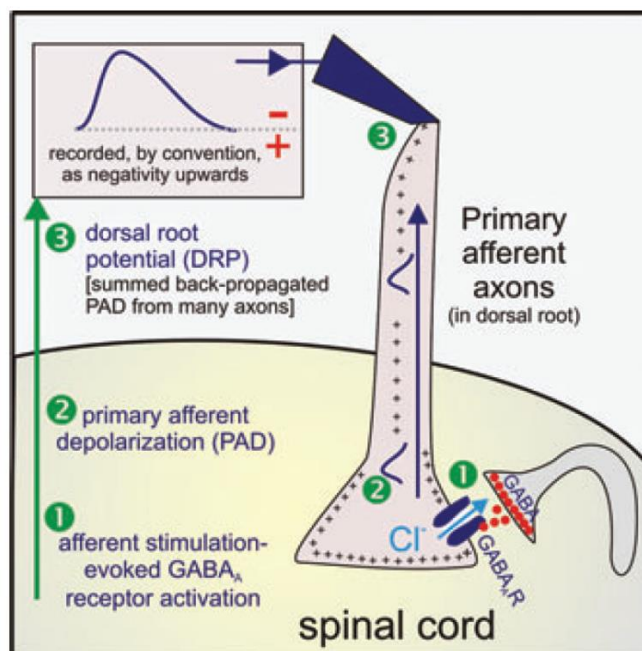


FIGURA 6. La PAD puede ser registrada como un DRP. La propagación pasiva y antidrómica de la onda despolarizante hacia la raíz dorsal permite que la PAD generada en varios axones sea registrada como un potencial de raíz dorsal (DRP) (Hochman et al., 2010).

El papel fisiológico de los DRRs es un tema interesante. Se han observado en animales despiertos durante la locomoción (véase Rossignol et al., 1998) y también se presentan en humanos (Shefner et al., 1992). De manera interesante, los potenciales de acción antidrómicos en las fibras nociceptivas inducen la liberación periférica de neuropéptidos que participan en la hiperalgesia y la inflamación neurogénica (Willis, 1999; Lin et al., 2007). En cambio, la relevancia fisiológica de los potenciales de acción antidrómicos en las fibras sensoriales de bajo umbral no ha sido estudiada con detalle.

2.2.6. PAD producida por la estimulación de fibras aferentes

Como se ha señalado, la estimulación eléctrica de las fibras aferentes primarias puede producir PAD en las mismas o en otras fibras aferentes (en este caso no deben confundirse las fibras que *producen* PAD con aquellas que

la *reciben*). Las observaciones electrofisiológicas llevadas a cabo en el gato adulto, basadas en la medición de la latencia de las respuestas en el SNC, han sugerido que la PAD generada por la estimulación de las fibras aferentes está mediada por circuitos neuronales que son, al menos, trisinápticos (Rudomin y Schmidt, 1999). Según este modelo, las interneuronas de último orden en las vías que median la PAD son GABAérgicas, mientras que las de primer orden son glutamatérgicas (figura 7).

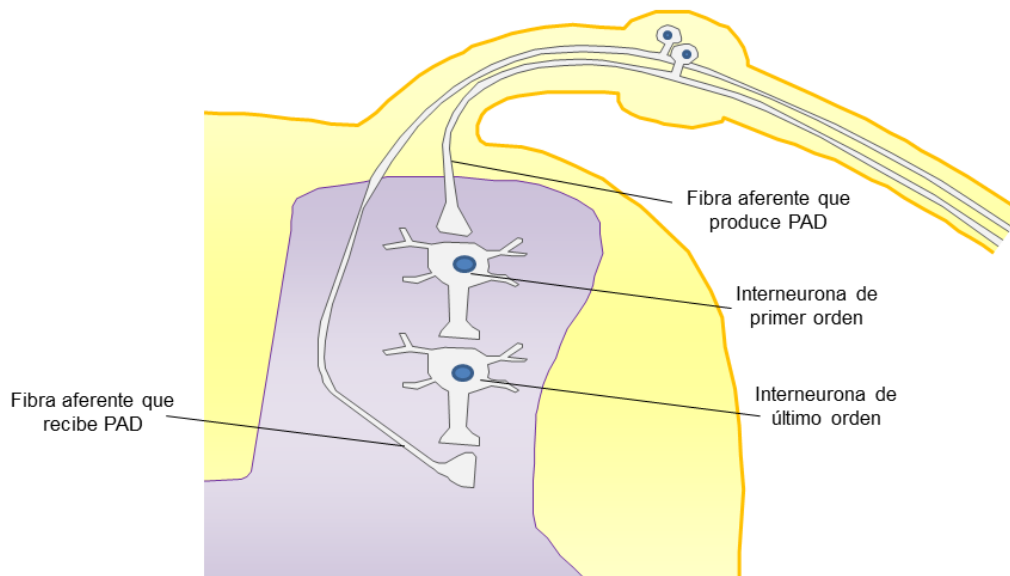


FIGURA 7. La PAD producida por la activación de las fibras aferentes primarias está mediada por circuitos tri- o polisinápticos. En el modelo representado aquí, la PAD generada por la estimulación de las fibras aferentes depende de la activación de un circuito trisináptico. Las interneuronas de primer orden liberan el neurotransmisor glutamato, mientras que las de último orden liberan GABA.

2.3. Mecanismos no clásicos de inhibición presináptica y PAD

2.3.1. Activación de receptores $GABA_A$ extrasinápticos

Los contactos axoaxónicos GABAérgicos establecidos sobre las terminaciones de las fibras aferentes primarias son el sustrato histológico

fundamental de la PAD clásica. Sin embargo, además de los receptores GABA_A presentes en estas sinapsis (receptores sinápticos o fásicos), se han descrito receptores GABA_A de localización extrasináptica en diferentes tipos de fibras aferentes primarias. Estos receptores parecen influir sobre la actividad de las fibras aferentes de manera tónica (Loeza-Alcocer et al., 2013; Lucas-Osma et al., 2018). Se ha propuesto que las células de los GRD expresan receptores GABA_A extrasinápticos (tónicos) que serían activados por las bajas concentraciones extracelulares de GABA y que podrían, entre otras cosas, ejercer acciones reguladoras de los DRRs.

2.3.2. Posible participación de otros transmisores y receptores

La PAD clásica se produce mediante la activación de receptores GABA_A localizados en las terminaciones intraespinales de las fibras aferentes primarias; estos receptores son activados por el neurotransmisor GABA liberado por las interneuronas de último orden que forman parte de los circuitos que producen la PAD (**figuras 5 y 7**). No obstante, la idea de que el GABA y los receptores GABA_A desempeñan una función predominante o exclusiva en la generación de PAD ha sido cuestionada de manera relativamente reciente con base en observaciones farmacológicas y anatómicas que indican una posible participación de otros transmisores y receptores. Algunas de las evidencias relacionadas con este aspecto se discuten a continuación.

Numerosos trabajos han demostrado la existencia de contactos axoaxónicos GABAérgicos localizados sobre las terminaciones de las fibras aferentes primarias (Maxwell et al., 1995; Destombes et al., 1996; Lamotte d'Incamps et al., 1998; Maxwell y Riddell, 1999; Watson y Bazzaz, 2001; Hughes et al., 2005), lo cual sustenta fuertemente la participación del GABA en la inhibición presináptica. Es posible, sin embargo, que no todas las formas de PAD estén relacionadas con estas terminaciones GABAérgicas. Por ejemplo, las interneuronas GABAérgicas podrían mediar la PAD evocada mediante la estimulación de estructuras supraespinales, pero no necesaria-

mente la PAD evocada por la estimulación de todos los tipos de fibras aferentes primarias.

Por otro lado, es probable que, además del GABA, otras sustancias sean capaces de activar los receptores GABA_A y producir PAD. La taurina y la β-alanina constituyen un ejemplo de dicha posibilidad (Hochman et al., 2010).

Los receptores GABA_A pertenecen a la familia *Cys-loop* de canales iónicos activados por ligando, la cual incluye también a los receptores a glicina, los receptores a serotonina 5-HT₃ y los receptores a acetilcolina nicotínicos (nAChRs). Todos estos receptores presentan similitudes en su arquitectura molecular, por lo que no debe pasarse por alto la posibilidad de que, dependiendo de las subunidades que los constituyen, existan reacciones farmacológicas cruzadas. Se ha reportado, por ejemplo, que la subunidad α₉ de los nAChR es inhibida por la bicuculina y la estriknina (Rothlin et al., 1999). Además, es posible el ensamblaje aberrante de receptores que incluyan combinaciones de subunidades de diferentes miembros de la familia *Cys-loop* (Li y Slaughter, 2007). Con base en lo anterior, sería importante reinterpretar cuidadosamente las observaciones clásicas, en las que la PAD y la inhibición presináptica se vieron reducidas mediante la administración de los antagonistas o bloqueadores tradicionales de los receptores GABA_A (Eccles et al., 1963; Schmidt, 1963; Davidoff, 1972).

Además de los receptores GABA_A, las fibras aferentes expresan otros receptores ionotrópicos de la familia *Cys-loop*, como los receptores a serotonina 5-HT₃ (Zeitz et al., 2002) y los nAChRs (Genzen et al., 2001; Lips et al., 2002; Haberberger et al., 2004). No obstante, la participación de estos receptores en la generación o modulación de PAD, de existir, está lejos de definirse con claridad. La serotonina produce una PAD lenta en la médula espinal *in vitro* de la rata, aunque no se halló una relación directa entre la magnitud de la PAD y la reducción de los EPSPs (Lopez-Garcia y King, 1996). En cuanto a los nAChRs, se desconoce si su activación está implicada en la producción o modulación de la PAD.

2.3.3. Posible producción de PAD mediante vías más directas

Convencionalmente se considera que la PAD evocada por la estimulación de las fibras aferentes primarias está mediada por circuitos que son, al menos, trisinápticos (**figura 7**). Sin embargo, este concepto ha sido puesto en duda por trabajos relativamente recientes que indican la participación de vías más directas para la producción de PAD.

La existencia de circuitos disinápticos que retroalimentan a las fibras aferentes primarias está apoyada por evidencias anatómicas (Olave et al., 2002; Bannatyne et al., 2009). Se ha publicado también que la estimulación de las fibras aferentes produce DRPs que, aunque son bloqueados mediante la administración de antagonistas de receptores GABA_A, conservan su amplitud después de restringir la transmisión a únicamente acciones monosinápticas en la médula espinal *in vitro* de la rata (**figura 8**) (Hochman et al., 2010; Shreckengost et al., 2010). En concordancia con esto, se observó que la mefenesina (un agente empleado para aislar componentes monosinápticos) aplicada por vía intravenosa tiene solamente un pequeño efecto sobre los DRPs registrados en la médula espinal del gato (Farkas et al., 1989). Hochman et al. (2010) han argumentado que, si se asume que la PAD se produce por una vía trisináptica, debería cuestionarse el hecho de que los anestésicos como el pentobarbital, que disminuyen la transmisión sináptica excitadora de manera generalizada, no depriman la PAD. Más aún, se ha reportado que el DRP evocado por fibras aferentes puede producirse mediante la participación de circuitos nerviosos insensibles a la tetrodotoxina (TTX) en la médula espinal de la tortuga (Russo et al., 2000). A partir de estas observaciones ha surgido la posibilidad de que la PAD producida por la activación de las fibras aferentes esté mediada por vías más directas que la vía trisináptica clásica.

¿Cómo podría explicarse la producción de PAD mediante vías más directas? Una primera alternativa es la existencia de circuitos disinápticos. En congruencia con esto, en la rata adulta se ha reportado que las interneuronas colinérgicas de la lámina III/IV del asta dorsal, que establecen contactos

axoaxónicos con las terminaciones de las fibras aferentes primarias, y que han sido consideradas posibles interneuronas de último orden en la producción de inhibición presináptica, reciben conexiones directas de las propias fibras aferentes (Olave et al., 2002). Resulta interesante la posibilidad de que estas interneuronas constituyan circuitos disinápticos que retroalimenten a las fibras aferentes primarias, o que sean capaces de producir PAD.

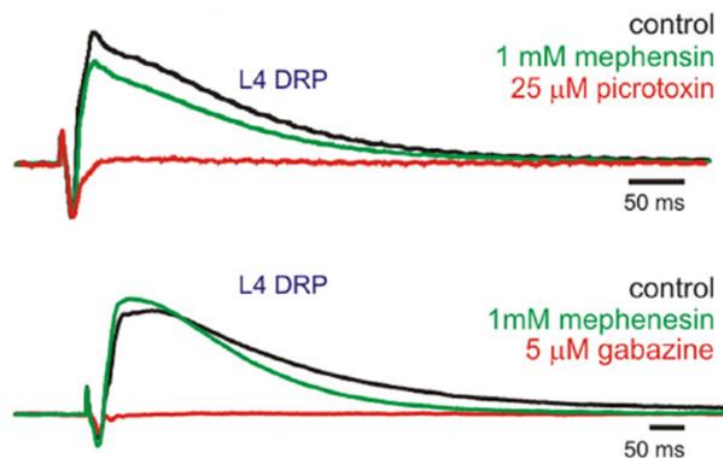


FIGURA 8. Los DRPs producidos por la activación de las fibras aferentes no se deprimen sustancialmente después de restringir la transmisión a acciones monosinápticas en la médula espinal *in vitro*. La mephenesina, un compuesto utilizado para aislar componentes monosinápticos, no bloquea los DRPs evocados mediante la estimulación de las fibras aferentes primarias. Los DRPs, sin embargo, pueden ser deprimidos con la administración de bloqueadores o antagonistas de los receptores GABA_A, como la picrotoxina y la gabazina. (Shreckengost et al., 2010).

Una segunda alternativa es que las propias fibras aferentes liberen transmisores que actúen directamente sobre las terminaciones de las mismas o de otras fibras aferentes. En diferentes regiones del SNC, los autorreceptores presinápticos constituyen de hecho una forma importante de inhibición presináptica (Engelman y MacDermott, 2004). Debe tenerse presente que, en el caso de las terminaciones intraespinales de las fibras

aferentes primarias, los transmisores liberados tendrían que ser capaces de activar a los receptores GABA_A (o a otros con propiedades farmacológicas similares). Sin embargo, la falta de estudios que apoyen la presencia de GABA en las terminaciones de las fibras sensoriales haría que el modelo de retroalimentación negativa directa fuese inconsistente con un mecanismo GABAérgico. De manera alternativa, la acetilcolina (ACh) podría jugar un papel en este sentido. Aunque se considera que las fibras aferentes primarias son primordialmente glutamatérgicas, se han descrito mecanismos de coliberación de glutamato y ACh en neuronas del SNC (Gras et al., 2008). Resulta muy interesante que las células de los GRD expresan proteínas involucradas en la síntesis (Bellier y Kimura, 2007; Matsumoto et al., 2007; Hanada et al., 2013) y el almacenamiento vesicular (Tata et al., 2004) de ACh. Las neuronas de los GRD expresan, además, diferentes tipos de nAChRs (Genzen et al., 2001; Lips et al., 2002; Haberberger et al., 2004).

También es interesante que, en la médula espinal *in vitro* de roedor, una buena parte del DRP evocado por la activación de fibras sensoriales puede persistir después de la administración de antagonistas de los receptores ionotrópicos a glutamato (Hochman et al., 2010). Si la PAD producida por la estimulación de las fibras aferentes depende de la activación de vías mono-, di- o polisinápticas, este hallazgo contrastaría con el principio de que las fibras aferentes primarias son glutamatérgicas. Como se mencionó, la liberación o coliberación de otros transmisores (en especial, de ACh) por parte de las fibras aferentes es una posibilidad interesante.

En resumen, existe evidencia que indica que la PAD tiene propiedades farmacológicas complejas y que puede ser generada mediante mecanismos diferentes de los considerados tradicionalmente. En particular, la PAD y la transmisión sináptica de las fibras aferentes primarias podrían estar moduladas por mecanismos que involucran la participación de la ACh y de los nAChRs.

2.4. Modulación de la transmisión sináptica por los nAChRs

La ACh actúa sobre dos tipos de receptores: 1) los receptores muscarínicos (mAChRs), que son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), y 2) los receptores nicotínicos (nAChRs), que pertenecen a la familia *Cys-loop* de canales iónicos activados por ligando. Estos últimos son receptores ionotrópicos que podrían desempeñar funciones relevantes en la generación o la modulación de la PAD.

Cada nAChR es un canal catiónico no selectivo conformado por cinco subunidades que constituyen un poro (**figura 9**) (Dani, 2015). Las cinco subunidades pueden ser idénticas entre sí (homómero) o formar combinaciones de dos o más subunidades diferentes (heterómero). En la diversidad de los nAChRs se han identificado diez subunidades α (α_1 - α_{10}) y cuatro subunidades β (β_1 - β_4). Las subunidades α_1 y β_1 , así como las subunidades γ , δ y ϵ , se han encontrado en los nAChRs del músculo, mientras que en el SNC de los mamíferos se han identificado ocho subunidades α (α_2 - α_{10} , exceptuando α_8) y tres β (β_{2-4}).

La modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas por la activación de los nAChRs ha sido sugerida por diversas observaciones. Las neuronas de los GRD expresan diferentes tipos de nAChRs (Genzen et al., 2001; Lips et al., 2002; Haberberger et al., 2004). También se han identificado sitios de unión a α -bungarotoxina, un antagonista de los nAChRs, en una población de neuronas sensoriales con soma grande en rata, mono, gato y humano, que parecen proyectar a la lámina III de las astas dorsales (Ninkovic y Hunt, 1983). Además, en la médula espinal *in vitro* del ratón juvenil, la administración de ciertos antagonistas de los nAChRs disminuye la amplitud de los DRPs (Hochman et al., 2010). En especial, la intervención de la ACh y de los nAChRs en la modulación de la información nociceptiva se encuentra ampliamente documentada (Naguib y Yaksh, 1994; Bannon et al., 1998; Decker et al., 2001; Jain, 2004; Matsumoto et al., 2007).

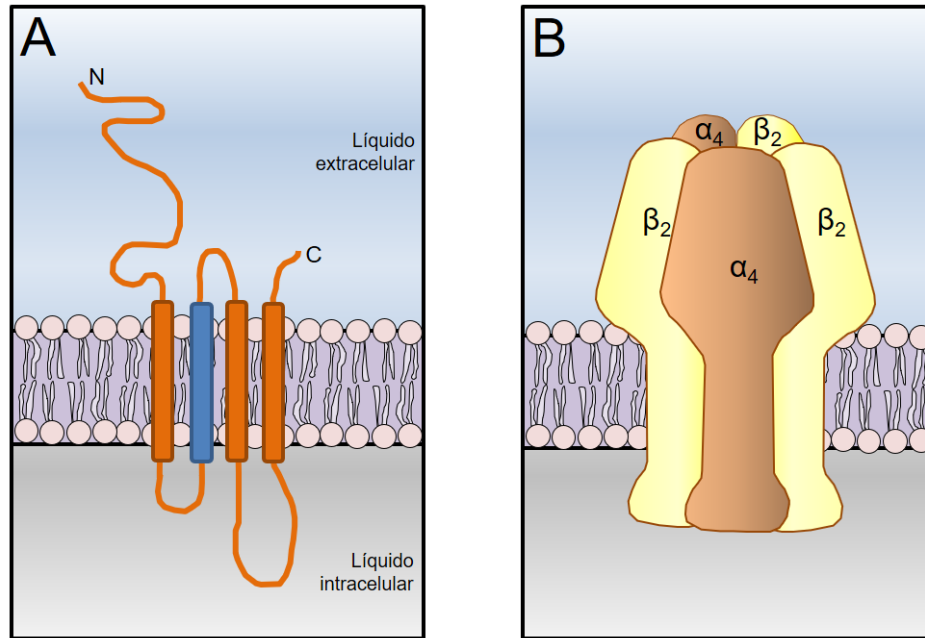


FIGURA 9. Cada nAChR es un complejo molecular constituido por cinco subunidades. **A.** Cada subunidad cruza la membrana cuatro veces. De los dominios que cruzan la membrana, el que delimita el poro (M2) se muestra en azul. **B.** Cinco de estas subunidades interaccionan para formar una estructura compleja que contiene un poro central (en este ejemplo se representa un heterómero $\alpha_4\beta_2$).

Aunque la ACh y los nAChRs han sido implicados en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes, la fuente endógena de ACh en la médula espinal sensorial no ha sido determinada con claridad. En principio, la ACh involucrada en la modulación de la información sensorial podría provenir de: 1) las interneuronas colinérgicas localizadas en el asta dorsal, 2) las propias fibras aferentes primarias, 3) fibras colinérgicas descendentes originadas en estructuras supraespinales o 4) diversas células y tejidos no nerviosos. Cada una de estas posibilidades se discute a continuación.

2.4.1. Interneuronas colinérgicas del asta dorsal

Una evidencia sustancial indica que la lámina III del asta dorsal de la médula espinal podría tener funciones particularmente importantes en la

modulación de la información sensorial. Este no solamente es un sitio de proyección prominente de las fibras A β y A δ , sino también un posible lugar de localización de las interneuronas de primer y último orden que median la PAD de las fibras aferentes cutáneas, según indican algunas observaciones electrofisiológicas (Jankowska et al., 1981).

En la lámina III, curiosamente, existe una pequeña población de neuronas colinérgicas (Barber et al., 1984; Mesnage et al., 2011) que podrían coliberar GABA (Todd, 1991; Mesnage et al., 2011) e intervenir en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes. De manera interesante, Ribeiro-da-Silva y Cuello (1990) reportaron la existencia de contactos colinérgicos establecidos sobre las fibras sensoriales primarias en el asta dorsal de la médula espinal de la rata. Las interneuronas colinérgicas de la lámina III, que podrían ser el principal origen de dichos contactos, han sido asociadas con un plexo colinérgico que estaría implicado en la modulación de la información sensorial (**figura 10**) (Mesnage et al., 2011; Pawlowski et al., 2013). Además, las interneuronas colinérgicas del asta dorsal reciben contactos directos de fibras aferentes mielinizadas y no mielinizadas (Olave et al., 2002). En conjunto, estas observaciones sugieren una relación íntima y recíproca entre las fibras sensoriales primarias y las interneuronas colinérgicas del asta dorsal, proporcionando una evidencia anatómica suficiente para sospechar que dichas interneuronas son una fuente natural de la ACh implicada en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes primarias.

2.4.2. Liberación de ACh por las fibras aferentes primarias

De manera alternativa, las propias fibras aferentes podrían liberar ACh y modular la transmisión sináptica mediante acciones autocrinas o paracrinas. Esta hipótesis ha recibido atención tras el descubrimiento de que las neuronas de los GRD expresan proteínas involucradas en la síntesis y el almacenamiento de ACh.

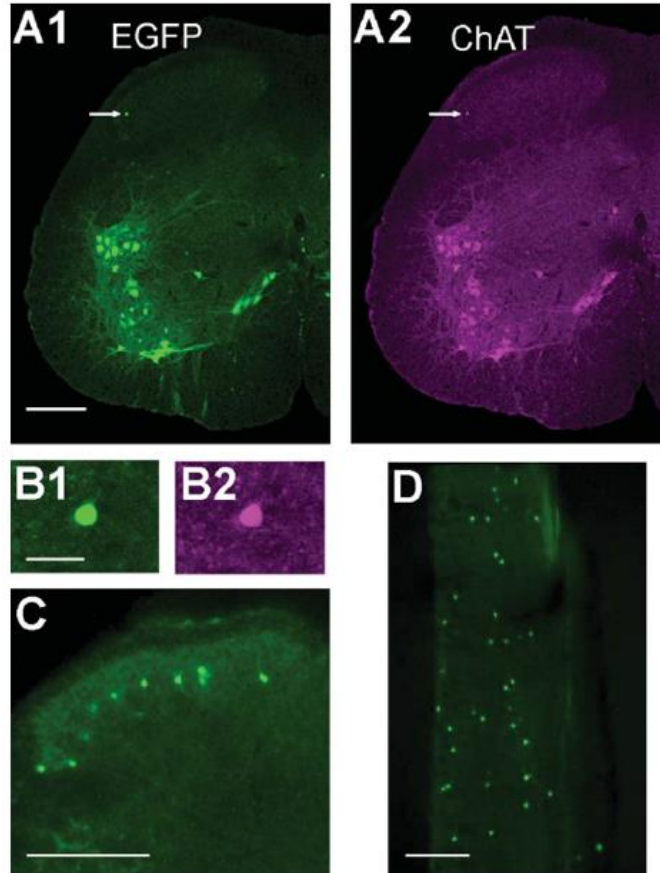


FIGURA 10. Identificación de la ChAT (enzima responsable de la síntesis de ACh) en la médula espinal de ratones transgénicos ChAT::EGFP. A. Señal EGFP intrínseca (A1) e inmunomarcado anti-ChAT (A2) en una sección transversal de la médula espinal de un ratón transgénico ChAT::EGFP. En estos ratones, la proteína EGFP (del inglés: *enhanced green fluorescent protein*) se expresa en las neuronas colinérgicas. Puede observarse una interneurona ChAT::EGFP (flecha) en el asta dorsal. **B.** Fotomicrografías de mayor aumento que muestran la neurona del asta dorsal observada en A. **C.** Señal EGFP intrínseca en el asta dorsal de una sección más gruesa. Pueden observarse múltiples neuronas ChAT::EGFP, así como un plexo de fibras ChAT::EGFP localizado dorsalmente. **D.** Señal EGFP intrínseca en un corte horizontal de una hemimédula espinal realizado en el nivel de las interneuronas ChAT::EGFP observadas en C. Barras = 200 μm en A,C y D; 25 μm en B. (Mesnage et al., 2011).

La enzima clásica responsable de la síntesis de ACh es la acetiltransferasa de colina (ChAT, por su nombre en inglés: *choline acetyltransferase*). Una variante periférica de esta enzima ha sido denominada

pChAT (del inglés: *ChAT of a peripheral type*) y es producida mediante empalme alternativo del ARNm de la ChAT (Tooyama y Kimura, 2000; Bellier y Kimura, 2011). La pChAT se distingue de la bien conocida cChAT (esta última llamada así del inglés: *ChAT of a common type*) porque carece de la secuencia peptídica codificada por los exones 6 a 9 (Tooyama y Kimura, 2000) y porque está sujeta a procesos de tráfico intracelular diferentes (Matsuo et al., 2005). Si la pChAT se localiza de manera preferencial en el sistema nervioso periférico (Tooyama y Kimura, 2000; Bellier y Kimura, 2011; Hanada et al., 2013), sería importante definir su posible participación en la síntesis de ACh por parte de las fibras aferentes primarias.

Las investigaciones sobre la expresión y la actividad de ChAT en las células de los GRD han arrojado resultados controversiales. Mientras algunos trabajos apoyan la expresión de pChAT, pero no de cChAT, en las neuronas de los GRD de roedor (Bellier y Kimura, 2007; Mesnage et al., 2011), otras observaciones realizadas en el ratón indican que la cChAT sí está presente en dichas células (Matsumoto et al., 2007). Más aún, algunos de los resultados reportados serían compatibles con una proporción reducida de neuronas pChAT en los GRD (Mesnage et al., 2011), pero otros indican una expresión prominente de pChAT en estas estructuras (Bellier y Kimura, 2007). Todos estos hallazgos, al menos, son consistentes con la expresión de pChAT en las neuronas de los GRD. En los trabajos de Bellier y Kimura (2007) se encontró que la pChAT se encuentra en las neuronas de los GRD de la rata exhibiendo una actividad enzimática suficiente para suministrar concentraciones fisiológicas de ACh. Por su parte, Hochman et al. (2010) publicaron que la pChAT se expresa en axones aferentes primarios que proyectan hacia las láminas profundas del asta dorsal, un patrón compatible con el de las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral. Por lo tanto, y pese a este debate, es posible que la pChAT esté involucrada en la síntesis y liberación de ACh por parte de las fibras aferentes mielinizadas.

Además de la acetiltransferasa de colina, las células de los GRD expresan otras proteínas características de las neuronas colinérgicas. Por ejemplo, el transportador vesicular de ACh (VAChT), una proteína requerida para el almacenamiento de ACh en vesículas sinápticas, está presente en algunas poblaciones de neuronas sensoriales de la rata, especialmente en aquellas de tamaño mediano y grande (Tata et al., 2004). También se ha hallado el ARNm de la proteína transportadora de colina 1 (CTL1) en neuronas de los GRD de la rata adulta (Traiffort et al., 2005).

Aunque estas investigaciones sugieren que las células de los GRD pueden sintetizar y almacenar ACh, la liberación sináptica de este neurotransmisor por parte de las fibras aferentes primarias aún no ha sido demostrada. Una alternativa interesante sería la liberación *extrasináptica* de ACh por las fibras nerviosas (Abramochkin et al., 2010; Brain, 2010). Tal mecanismo podría regular de manera tónica la excitabilidad de membrana y la propagación de espigas actuando a lo largo de los axones y en sus puntos de ramificación. Cabe señalar que la inhibición presináptica ejercida sobre puntos de ramificación axónica ya ha sido documentada en animales invertebrados (Cattaert y El Manira, 1999).

2.4.3. Liberación de ACh por fibras descendentes

En contraste con los sistemas monoaminérgicos descendentes, que han sido ampliamente descritos (Jones, 1991; Fung et al., 1994; Klein et al., 2019), existen observaciones que apoyan la ausencia de una inervación colinérgica descendente en la médula espinal. Por ejemplo, la actividad de ChAT en la materia gris de las regiones caudales de la médula espinal cervical del gato se mantuvo sin cambios después de una sección realizada en el nivel cervical superior (Kanazawa et al., 1979). En otro estudio realizado en la rata, ninguna de las células identificadas con proyecciones bulboespinales fue reconocida como colinérgica (Sherriff et al., 1991). Estos hallazgos son consistentes con la noción de que la inervación colinérgica de la médula

espinal es de origen intrínseco o periférico. Sin embargo, existe una publicación relativamente reciente en la que se identificó un grupo de neuronas colinérgicas localizadas en la región rostral ventrolateral del bulbo raquídeo del ratón; estas neuronas, curiosamente, emiten proyecciones descendentes hacia la lámina III de la médula espinal, sugiriendo una posible participación en la modulación de la información sensorial ([Stornetta et al., 2013](#)).

2.4.4. ACh procedente de otras fuentes

Los componentes de los sistemas colinérgicos están presentes en muchas células y tejidos no nerviosos, en donde han sido asociados con funciones diversas ([Kawashima y Fujii, 2008](#); [Fujii et al., 2017](#)). Es posible, por lo tanto, que la ACh que participa en la modulación de las fibras aferentes primarias provenga de diferentes tipos celulares.

La capacidad de la ACh para ejercer sus efectos en sitios que se encuentran alejados de las sinapsis colinérgicas sería difícil de explicar mediante la difusión, especialmente por la presencia de colinesterasas en los fluidos extracelulares, las cuales son enzimas extremadamente eficientes para degradar ACh. No obstante, hay evidencia que indica que la ChAT, que es considerada usualmente como una enzima intracelular localizada en las neuronas colinérgicas, también está presente en los compartimientos extracelulares, como el plasma y el líquido cerebroespinal ([Vijayaraghavan et al., 2013](#)). Por lo tanto, un balance entre la síntesis y la degradación extracelulares de ACh podría ser crítico para determinar la concentración de este transmisor en diferentes compartimientos corporales. Los linfocitos y los astrocitos podrían ser una fuente importante de esta ChAT extracelular (**figura 11**) ([Vijayaraghavan et al., 2013](#)).

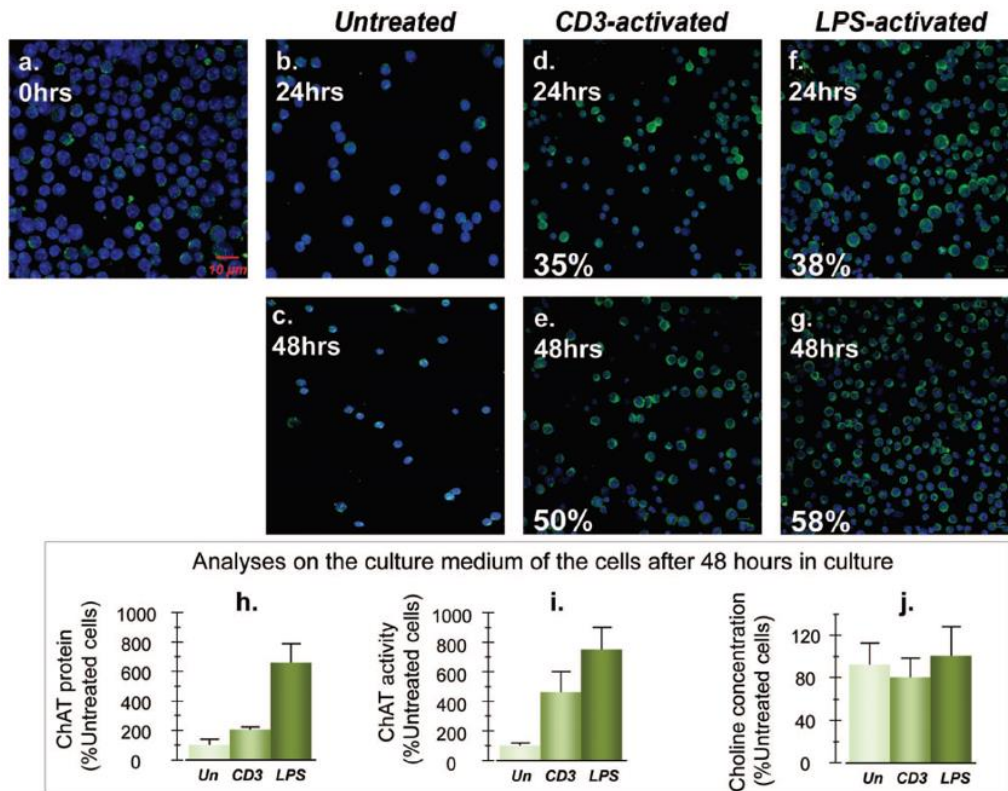


FIGURA 11. Los linfocitos activados de ratón liberan ChAT. Los esplenocitos en estado inicial (a) o sin estimulación (b-c) muestran muy poca inmunorreactividad a ChAT. En contraste, la estimulación con un anticuerpo específico (d-e) o, especialmente, con LPS (f-g) da como resultado una marcada expresión de ChAT en las células. Las mediciones de la proteína ChAT (h), la actividad de ChAT (i) y la concentración de colina (j) en el medio de cultivo indican que las células estimuladas liberaron ChAT (Vijayaraghavan et al., 2013).

En resumen, se desconocen los mecanismos por los que se produce la activación de los nAChRs en las terminaciones de las fibras aferentes primarias o en las interneuronas que median la PAD, así como los efectos que tiene dicha activación sobre la inhibición o facilitación presinápticas. A partir de los antecedentes presentados aquí, resulta necesario explorar más a fondo el papel de la ACh y los nAChRs en la modulación de la excitabilidad de las fibras aferentes y en los mecanismos que controlan la transmisión sináptica de las mismas.

3. Planteamiento del problema y objetivos

La médula espinal es un centro importante de integración, en el que la información sensorial procedente de la periferia es modulada mediante diversos mecanismos presinápticos y postsinápticos. El papel de varios aminoácidos y monoaminas en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes ha recibido atención en trabajos previos. En este sentido, no obstante, hace falta información sobre la función de la ACh y los nAChRs, en particular en relación con la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral (mielinizadas).

Las fibras aferentes primarias expresan nAChRs y se ha mostrado que la PAD inducida mediante la estimulación eléctrica de las fibras sensoriales es sensible a la administración de ligandos que tienen como blanco a estos receptores. Los nAChRs involucrados en la modulación de la PAD podrían ser activados por la ACh procedente de las interneuronas colinérgicas o de las propias fibras aferentes primarias, y podrían estar presentes en las fibras aferentes mielinizadas o en las interneuronas que median la PAD.

En el presente trabajo nos hemos propuesto determinar el papel de la ACh y de los nAChRs en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral utilizando como modelo la preparación *in vitro* de la hemimédula espinal del ratón neonato.

Hipótesis

La ACh modula la vía neuronal que produce la despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD), a través de la activación de nAChRs presentes en las propias fibras aferentes y/o en las interneuronas que median la PAD.

Objetivo general

Investigar el papel de la ACh y de los nAChRs en la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas, así como en las vías neuronales que producen la inhibición presináptica asociada a la PAD en la médula espinal aislada del ratón.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la ACh y de la nicotina en el componente monosináptico de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados en el asta dorsal y en los potenciales de raíz dorsal (DRPs), producidos por la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas.
2. Investigar el efecto de la ACh y de la nicotina en la excitabilidad de las fibras aferentes mielinizadas.
3. Examinar el efecto de la nicotina sobre la depresión homosináptica de los EFPs evocados por la estimulación de las aferentes de bajo umbral.
4. Determinar el efecto de la nicotina sobre la inhibición presináptica asociada a la PAD, estimada a partir de la depresión de los EFPs producidos por la estimulación condicionante de fibras aferentes heterónimas.
5. Investigar el efecto de la nicotina sobre las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs) evocadas en interneuronas del asta dorsal por la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas, así como sobre las propiedades pasivas de las neuronas registradas (R_m , C_m y τ_m).

4. Métodos

4.1. Preparación de la médula espinal *in vitro*

Todos los experimentos se realizaron en ratones de la cepa BALB/c de 6 días postnatales y de sexo indistinto. Para el montaje de la preparación de la médula espinal *in vitro*, los animales se sacrifican y evisceran rápidamente, conservando el tronco vertebral con parte de las costillas y la musculatura paravertebral. Luego, la preparación se transfiere para su disección a una cámara de 150 mL que contiene líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial a 5 °C, el cual presenta la siguiente composición (mM): sacarosa 230, KCl 3, NaH₂PO₄·H₂O 1.2, CaCl₂·2H₂O 0.5, MgSO₄ 10, NaHCO₃ 25, D-Glucosa 11. El LCR se burbujea a nivel de saturación con una mezcla de carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂). La región lumbosacra de la médula espinal se expone mediante una vertebrectomía, manteniendo íntegras las raíces dorsales (RDs) en continuidad con el nervio ciático (Sci) y sus ramificaciones. Se cortan las raíces ventrales y se efectúa una hemisección sagital de la médula. Las ramas del nervio Sci se disecan: tibial (Tib), sural (Su), peroneo superficial (SP) y peroneo profundo (DP), seccionándolas lo más distalmente posible. Posteriormente, la preparación se transfiere a una cámara de registro de 130 mL que se perfunde a flujo constante (15-20 mL/min) con LCR artificial a 23 °C, el cual tiene la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, NaH₂PO₄·H₂O 1.25, CaCl₂·2H₂O 2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 26, D-Glucosa 25. La solución de registro se burbujea continuamente con una mezcla de carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂) con el fin de ajustar el pH a 7.4. Durante el experimento, la médula espinal se mantiene fija mediante el uso de agujas entomológicas, con la superficie de la hemisección dispuesta en un ángulo de 45°.

4.2. Estimulación y registro

Estimulación. Los nervios periféricos (o las RDs en algunos experimentos) se estimularon de manera monopolar mediante electrodos de succión

colocados distalmente (**figura 12**), con el electrodo de referencia (plata) enrollado alrededor del electrodo de succión. Para la estimulación, se aplicaron pulsos cuadrados con una duración de 0.2 ms, a una frecuencia de 0.1 Hz, y con intensidades iguales o menores que 2 veces el valor umbral (2 xU) de las fibras más excitables, con lo que se reclutan las fibras de bajo umbral (las fibras de los grupos I y II procedentes de los músculos y las fibras cutáneas A β) ([García-Ramírez et al., 2014](#)).

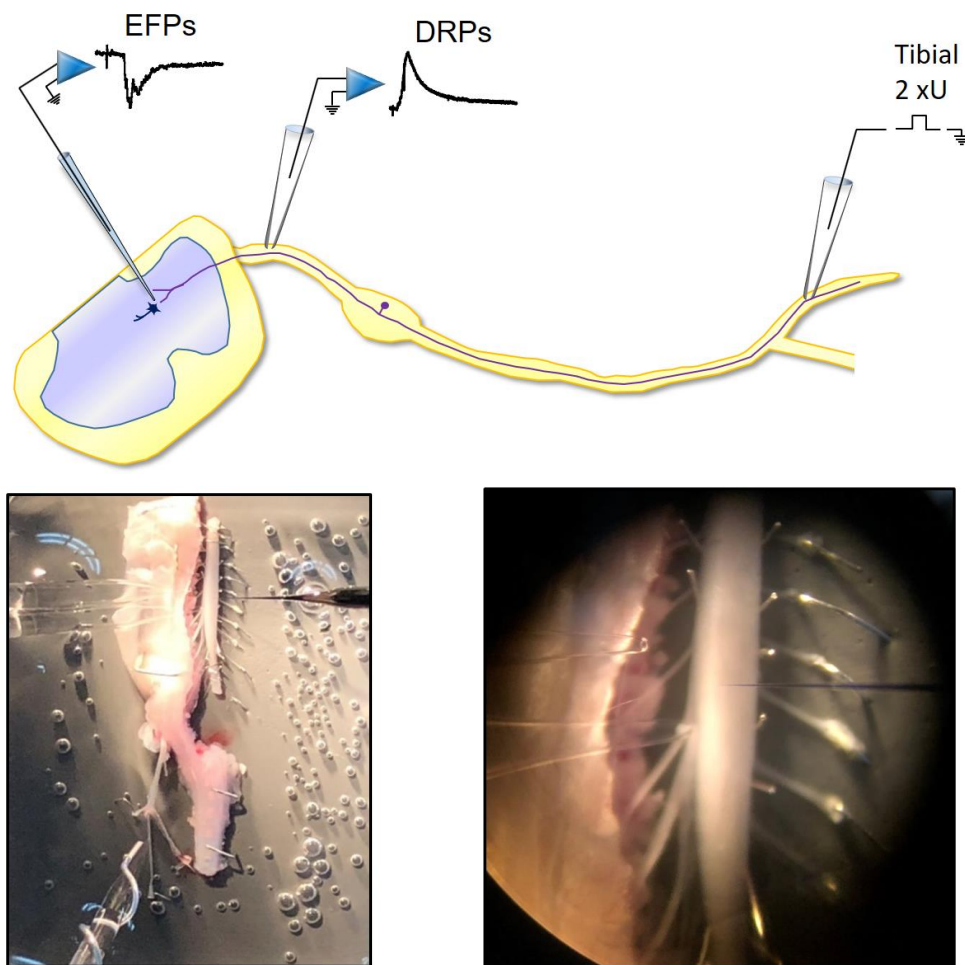


FIGURA 12. Esquema y fotografías del arreglo experimental de la médula espinal aislada de ratón neonato. Se puede observar el electrodo de estimulación colocado en una región distal del nervio tibial, el electrodo de registro de DRPs colocado en la porción proximal de la RD L₄, y el electrodo de registro de EFPs introducido con un ángulo de 90° sobre la superficie de la médula espinal hemiseccionada.

Registro. Los potenciales de raíz dorsal (DRPs) se registraron con un electrodo de succión de $\approx 120 \mu\text{m}$ de diámetro que se coloca sobre la raíz dorsal L₄ (RD L₄), lo más proximal posible a la médula espinal. Por su parte, los potenciales extracelulares de campo (EFPs) se registraron con una micropipeta que tiene una resistencia de 2-4 M Ω y que contiene una mezcla de NaCl (2 M) y azul de pontamina; la micropipeta se inserta entre los segmentos espinales L₃-L₄ con un ángulo de 90° en relación con la superficie hemiseccionada, tomando como referencia el borde de las columnas dorsales y el canal central (**figura 12**).

Los EFPs se registraron mediante un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments, Molecular Devices). Los DRPs se registraron con amplificadores acoplados a DC (A-M Systems, filtro pasa bandas DC – 3 KHz). Las señales fueron capturadas con el programa pClamp (v 10.2, Axon Instruments, Molecular Devices) con una frecuencia de muestreo de 20 KHz para su almacenamiento en una computadora PC y posterior análisis.

4.3. Protocolo para determinar las depresiones homosináptica y heterosináptica

Para evaluar la depresión homosináptica se utilizó un protocolo de pulsos pareados en el que, de manera secuencial: A) se aplica el estímulo de prueba a la RD L₄, B) se aplica el estímulo condicionante a la misma raíz, C) se aplican ambos estímulos, con un determinado intervalo de tiempo entre ellos (IEE), y D) se resta el registro obtenido en la condición B al registro obtenido en la condición C, con lo que se obtiene el efecto de la estimulación condicionante sobre el estímulo de prueba (**figura 13**). El procedimiento se repite varias veces para estimar la depresión homosináptica de los EFPs con diferentes IEEs (25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ms). A partir de los resultados obtenidos se elabora una gráfica que muestra el curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs.

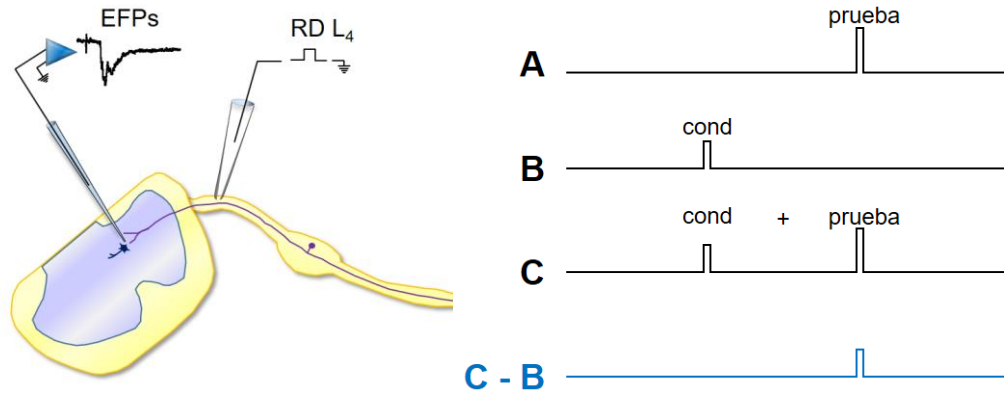


FIGURA 13. Protocolo de pulsos pareados para estimar la depresión homosináptica. El efecto de la estimulación condicionante sobre el estímulo de prueba se obtiene restando la condición B a la condición C. La depresión homosináptica se estima comparando la condición C-B con la condición A.

La depresión heterosináptica de los EFPs se estimó de manera similar, mediante la aplicación de pulsos pareados con distintos IEEs. Sin embargo, en este protocolo los estímulos condicionante y de prueba fueron aplicados mediante electrodos de succión colocados en RDs diferentes (L₃ y L₄).

4.4. Técnica de Wall

Los cambios en la excitabilidad de las fibras aferentes fueron estudiados mediante la técnica de Wall. Los potenciales de acción compuestos (PAC) antidrómicos fueron producidos mediante la microestimulación intraespinal (pulsos de 500 μ s, a una intensidad submáxima para la generación de los PACs) y registrados en la RD L₄ con un electrodo de succión. La micropipeta utilizada para la microestimulación contenía una mezcla de NaCl (2 M) y azul de pontamina. La localización de las terminaciones intraespinales de las fibras aferentes fue determinada utilizando como referencia los sitios de registro de los EFPs con la mayor amplitud. Un incremento en los PACs antidrómicos se interpreta como un aumento en la excitabilidad de las terminales intraespinales de las fibras aferentes.

4.5. Control de corriente y voltaje en la configuración de célula entera

Las micropipetas de registro se elaboraron a partir de capilares de borosilicato de pared delgada, con un diámetro externo de 1.5 mm (World Precision Instruments), que fueron estirados en un proceso de dos pasos (Narishige PC-10). Las micropipetas se llenaron con una solución para registro intracelular que tiene la siguiente composición (en mM): Gluconato de potasio 120, KCl 10, NaCl 10, EGTA 0.20, HEPES 10, ATP 4, GTP 1, QX-314 5 (empleado para inhibir las conductancias rápidas de Na⁺), ajustando el pH a 7.3 con NaOH. La técnica de registro de control de voltaje y corriente a ciegas (*blind patch*) en la modalidad de célula entera (*whole cell clamp*) se realizó a temperatura ambiente utilizando un amplificador Axoclamp 700B (Molecular Devices). Para la aplicación de protocolos de estimulación y captura de datos se empleó una tarjeta analógico-digital Digidata 1440A y el software pClamp 10 (Axon Instruments, Molecular Devices). La micropipeta, que tiene una resistencia de 5-7 MΩ, se introduce con un ángulo de 90° sobre la superficie hemiseccionada de la médula espinal en dirección a la zona profunda del asta dorsal a nivel L₃-L₄. Las interneuronas registradas se localizan entre 50 y 150 μm de profundidad, en el área que corresponde al registro de los EFPs de mayor amplitud. Una vez establecido un sello de alta impedancia (gigasello, > 1GΩ), se permite un tiempo de estabilización y se procede a la ruptura del parche mediante la aplicación de presión negativa. De esta manera, se registraron las EPSCs provocadas por la estimulación de la RD L₄. Los resultados se analizaron con el programa Clampfit y la estadística se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism.

4.6. Fármacos

Los fármacos se prepararon en alícuotas a concentraciones altas (1-10 mM) que se almacenaron a -20 °C. Cuando fueron requeridos, se diluyeron en el LCR artificial de registro para alcanzar las concentraciones deseadas. Los efectos de los fármacos se determinaron mediante un cálculo porcentual de la

respuesta obtenida tras la acción del fármaco (3-8 min después de su aplicación) con respecto al registro control. En algunos casos, se realizaron registros después de un lavado para evaluar la recuperación posterior a la acción del fármaco.

5. Resultados

5.1. EFPs y DRPs evocados por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral

La **figura 14** muestra el potencial de raíz dorsal (DRP) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación del nervio tibial a una intensidad 2 xU (Tib 2 xU), con la cual se reclutan únicamente fibras aferentes mielinizadas de bajo umbral ([García-Ramírez et al., 2014](#)). El DRP fue registrado en la raíz dorsal (RD) L₄ (**figura 14A**), mientras que los EFPs fueron registrados a distintas profundidades del segmento espinal L₄ (**figura 14B**) con el fin de determinar la localización de las proyecciones intraespinales de las fibras aferentes de bajo umbral.

Los EFPs son registros poblacionales que reflejan las corrientes postsinápticas que tienen lugar en las neuronas localizadas cerca de la punta de la micropipeta de registro. El componente de menor latencia en los EFPs corresponde a la estimulación monosináptica de las interneuronas del asta dorsal y es consecuencia de la activación de las fibras aferentes de mayor velocidad de conducción. Por su parte, los componentes de mayor latencia se deben a la activación de las fibras de menor velocidad de conducción, así como a la activación de vías oligosinápticas.

Para corroborar que la estimulación de Tib 2 xU produce la activación selectiva de las fibras aferentes mielinizadas, se estimuló el extremo proximal de la RD L₄ y se registró el potencial de acción compuesto (PAC) propagado de manera antidrómica en el extremo distal de la misma raíz (**figura 15**). Con intensidades iguales o menores que 2 xU se registra únicamente el componente de mayor velocidad de conducción, que corresponde a la activación de las fibras de los grupos I y II procedentes de los músculos y las fibras cutáneas A β . Con una estimulación de mayor intensidad se consigue el reclutamiento de componentes de mayor latencia, que se atribuyen a la activación de las fibras de los grupos III y IV y las fibras A δ y C.

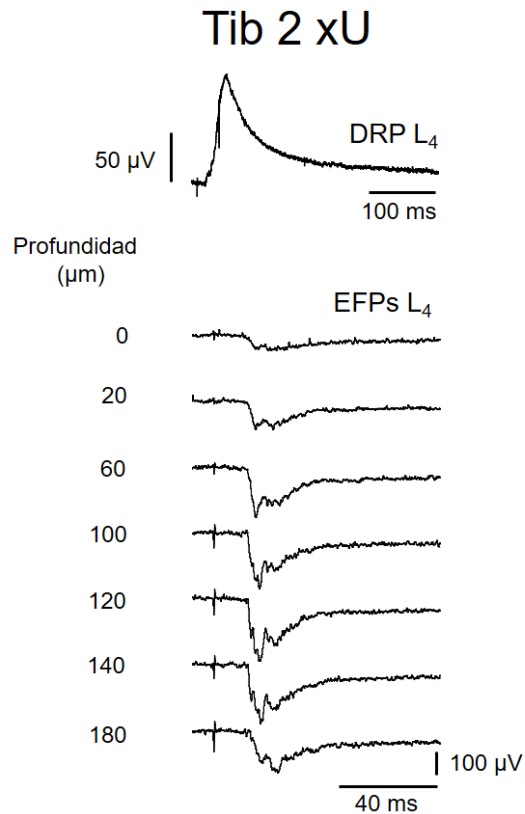


FIGURA 14. DRP y EFPs evocados por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral. *Panel superior.* DRP registrado en la RD L₄ tras la estimulación del nervio tibial 2 xU. En este experimento, los DRPs presentaron una amplitud de $\approx 110 \mu\text{V}$ y un tiempo al pico de $\approx 34 \text{ ms}$. *Panel inferior.* EFPs registrados a distintas profundidades en el segmento L₄ tras la estimulación de Tib 2 xU. En este experimento en particular, los EFPs de mayor amplitud se registraron entre 100 y 140 μm de profundidad. Cada trazo representa el promedio de 6 muestras.

5.2. EFPs y DRPs evocados por la estimulación del nervio tibial a diferentes intensidades

La **figura 16** muestra los EFPs y DRPs producidos mediante la estimulación del nervio tibial a distintas intensidades. La estimulación con intensidades graduadas permite observar los efectos que resultan del reclutamiento secuencial de diferentes tipos de fibras aferentes. Obsérvese que tanto los EFPs (registrados en el nivel espinal L₄ y a la misma profundidad) como los DRPs (registrados en la RD L₄) presentan componentes de diferentes

latencias. Los componentes de mayor latencia, que aparecen con intensidades de estimulación > 2 xU, se atribuyen a la activación de las fibras aferentes de alto umbral. Nótese también que la amplitud de los diferentes componentes de los EFPs y DRPs aumenta al incrementar la intensidad de la estimulación.

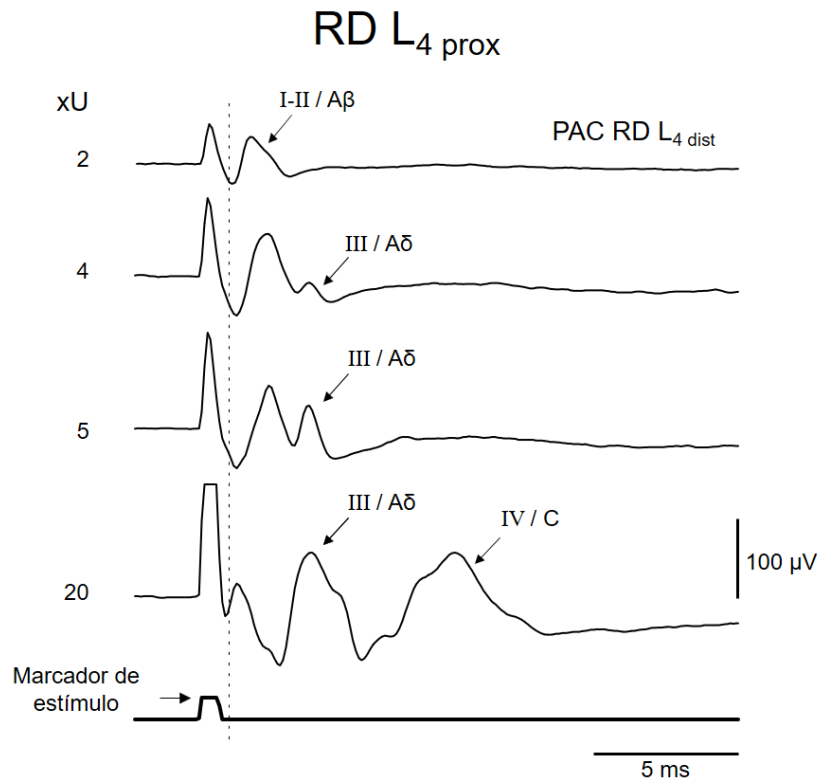


FIGURA 15. Con una intensidad de estimulación 2 xU se reclutan solamente fibras aferentes mielinizadas. Después de estimular la región proximal de la RD L₄ con una intensidad 2 xU, se registra únicamente el componente de mayor velocidad de conducción en la región distal de dicha raíz. Otros componentes se reclutan con intensidades de estimulación mayores. PAC = potencial de acción compuesto, RD = raíz dorsal. Cada trazo representa el promedio de 24 muestras.

5.3. Efecto de la ACh y la nicotina en los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral

La figura 17 muestra el efecto de la ACh sobre los EFPs y DRPs evocados por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral del nervio

tibial. En presencia de neostigmina ($20 \mu\text{M}$), y ocho minutos después de la aplicación de ACh ($50 \mu\text{M}$), los EFPs y los DRPs mostraron una depresión casi completa. Este efecto prácticamente no se revirtió después de 32 minutos de lavado. En todos los experimentos con ACh se utilizó neostigmina para bloquear la acetilcolinesterasa.

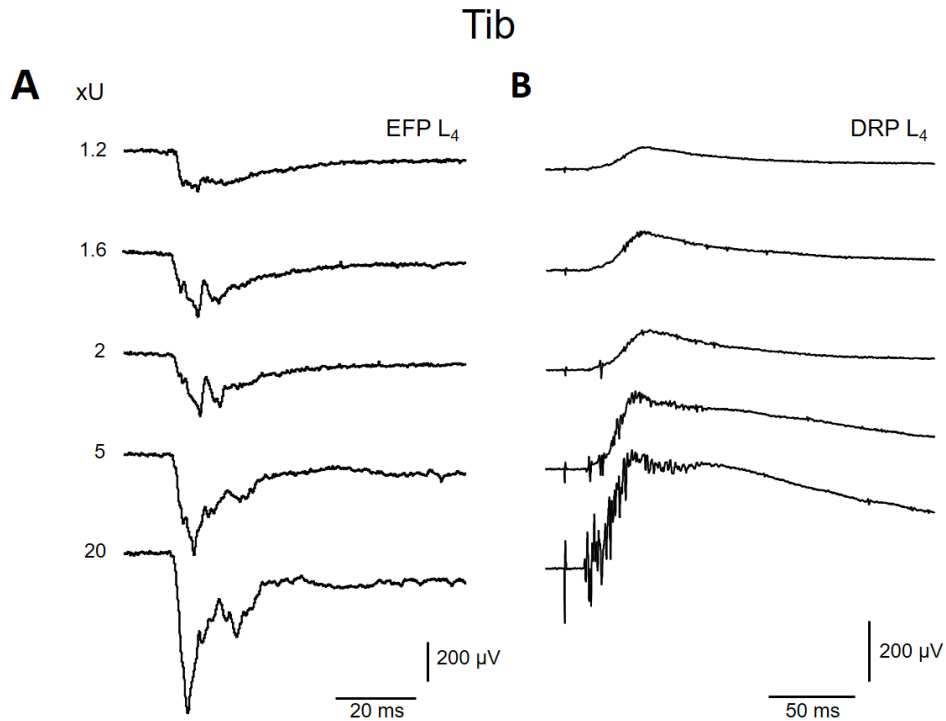


FIGURA 16. EFPs y DRPs producidos mediante la estimulación del nervio tibial a diferentes intensidades. A. EFPs registrados en el nivel L₄ y a una profundidad de $120 \mu\text{m}$ tras la activación del nervio tibial a intensidades de 1.2, 1.6, 2, 5 y 20 veces el valor de la intensidad umbral para las fibras más excitables. **B.** DRPs registrados en la RD L₄ como resultado de la estimulación del nervio tibial a las mismas intensidades. Cada trazo representa el promedio de 6 muestras.

Para investigar si los efectos observados con la administración de ACh también pueden ser producidos por la nicotina, se estudió el efecto de esta última sobre los EFPs y DRPs evocados mediante la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral del nervio tibial. La **figura 18** muestra un experimento

en el que, cuatro minutos después de la administración de nicotina ($10 \mu\text{M}$), puede apreciarse una depresión en la amplitud de los EFPs, un efecto que fue parcialmente revertido después de seis minutos de lavado. La **figura 19A** resume los efectos de la nicotina sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral de la RD L₄. Obsérvese que la depresión de los EFPs en presencia de nicotina también fue estadísticamente significativa después de la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas del nervio tibial (**figura 19B**).

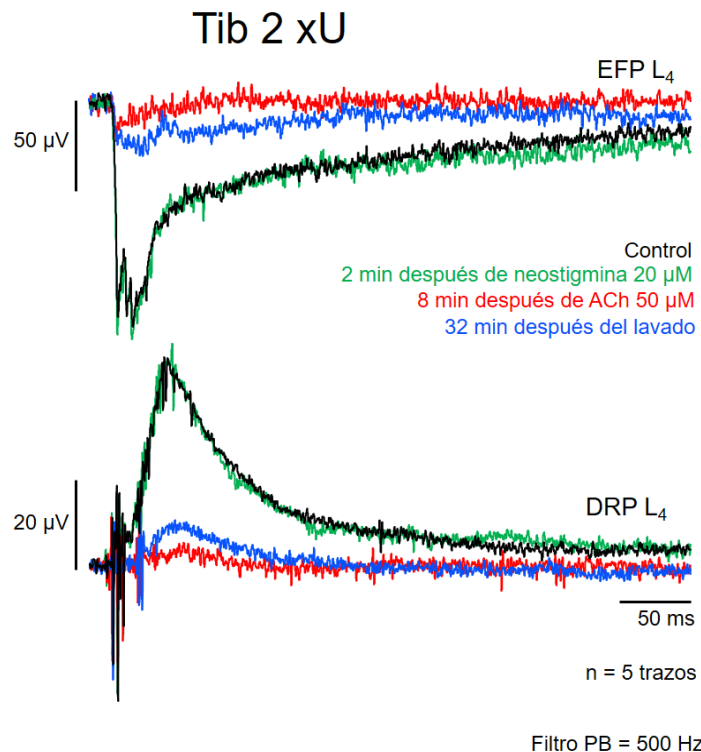


FIGURA 17. La ACh deprime tanto los EFPs como los DRPs evocados por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral del nervio tibial. EFPs (panel superior) y DRPs (panel inferior) evocados mediante la estimulación del nervio tibial (Tib) 2 xU en condiciones control (negro), a los 2 minutos de la aplicación de neostigmina 20 μM (verde), a los 8 minutos de la aplicación posterior de ACh 50 μM (rojo) y a los 32 minutos del lavado (azul). Cada trazo representa el promedio de 5 muestras. En este experimento, los EFPs fueron registrados a una profundidad de 120 μm .

Tib 2 xU

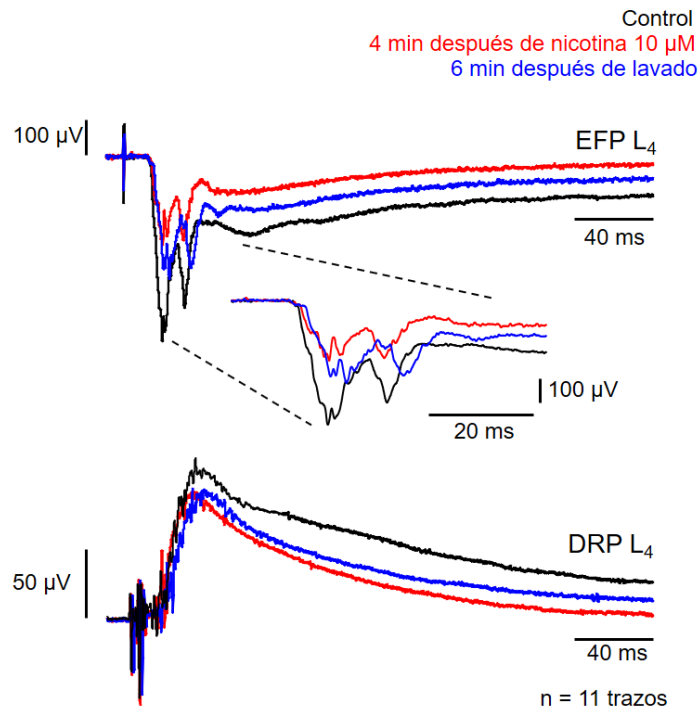


FIGURA 18. Efecto de la nicotina sobre los EFPs y DRPs evocados por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral del nervio tibial. EFPs (panel superior) y DRPs (panel inferior) evocados mediante la estimulación del nervio tibial (Tib) 2 xU en condiciones control (negro), a los 4 minutos de la aplicación de nicotina 10 μM (rojo) y a los 6 minutos del lavado (azul). *Inserto:* EFPs desplegados con una mayor velocidad de barrido. Cada trazo representa el promedio de 11 muestras. En este experimento, los EFPs fueron registrados a una profundidad de 60 μm.

La reducción de la amplitud del componente monosináptico de los EFPs en presencia de ACh o nicotina indica una disminución de la transmisión sináptica entre las fibras aferentes mielinizadas y sus neuronas blanco en la médula espinal. Esto mismo explicaría la disminución observada en la amplitud de los DRPs, pues la activación de los circuitos espinales que producen la PAD se ve afectada si se compromete la transmisión sináptica de las fibras aferentes. No obstante, la depresión de los DRPs también podría deberse a una disminución de la excitabilidad de las interneuronas que median la PAD.

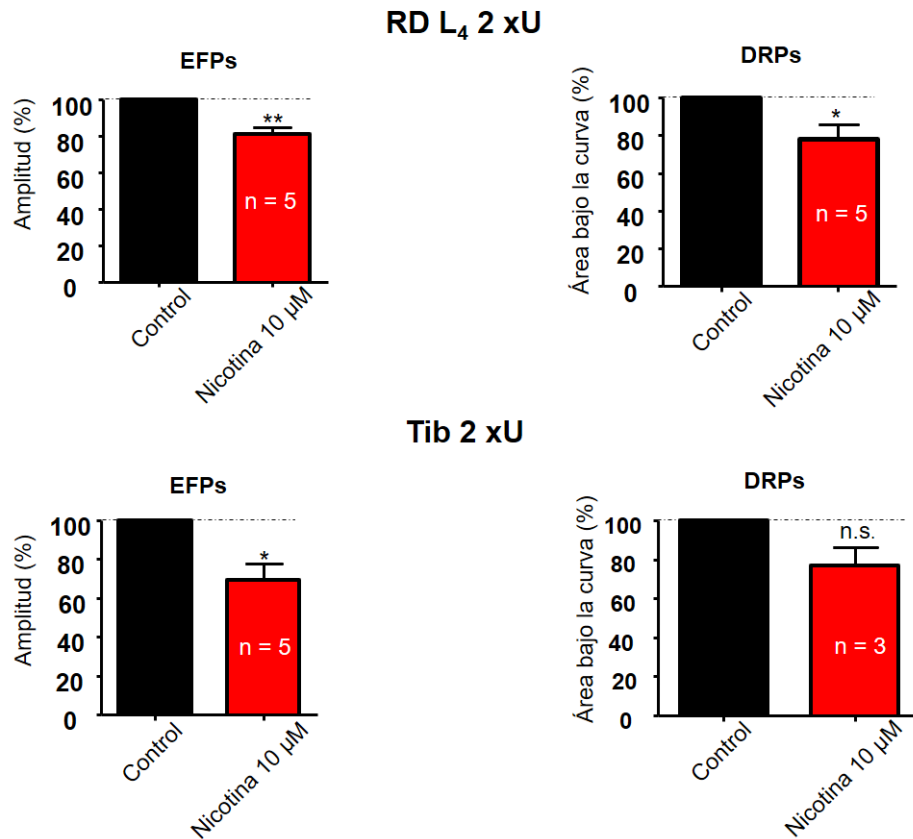


FIGURA 19. La nicotina reduce los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes. Los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de la RD L₄ a una intensidad 2 xU, y los EFPs producidos por la estimulación del nervio tibial a la misma intensidad, muestran una depresión estadísticamente significativa en presencia de nicotina. Aunque la depresión de los DRPs evocados por la estimulación del nervio tibial no fue estadísticamente significativa, se observa una tendencia compatible con el efecto depresor de la nicotina. La magnitud del efecto se determinó a partir de la amplitud del componente monosináptico (porcentaje con respecto del control) en el caso de los EFPs, y a partir del área bajo la curva (porcentaje con respecto del control) en el caso de los DRPs. (n.s.) $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, prueba t pareada.

5.4. Potencia de la ACh y la nicotina en la depresión de los EFPs y DRPs

Para determinar la potencia de la ACh y la nicotina en el efecto depresor de los EFPs y DRPs, se calcularon los valores de IC₅₀ correspondientes aplicando concentraciones crecientes y acumulativas de estas drogas (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM). En los experimentos efectuados

(**figuras 20 y 21**), se aprecia el ajuste a una forma sigmoidea. Las IC_{50} calculadas se encuentran en el rango nM o μ M bajo, lo cual sugiere una alta afinidad de los ligandos por los receptores involucrados.

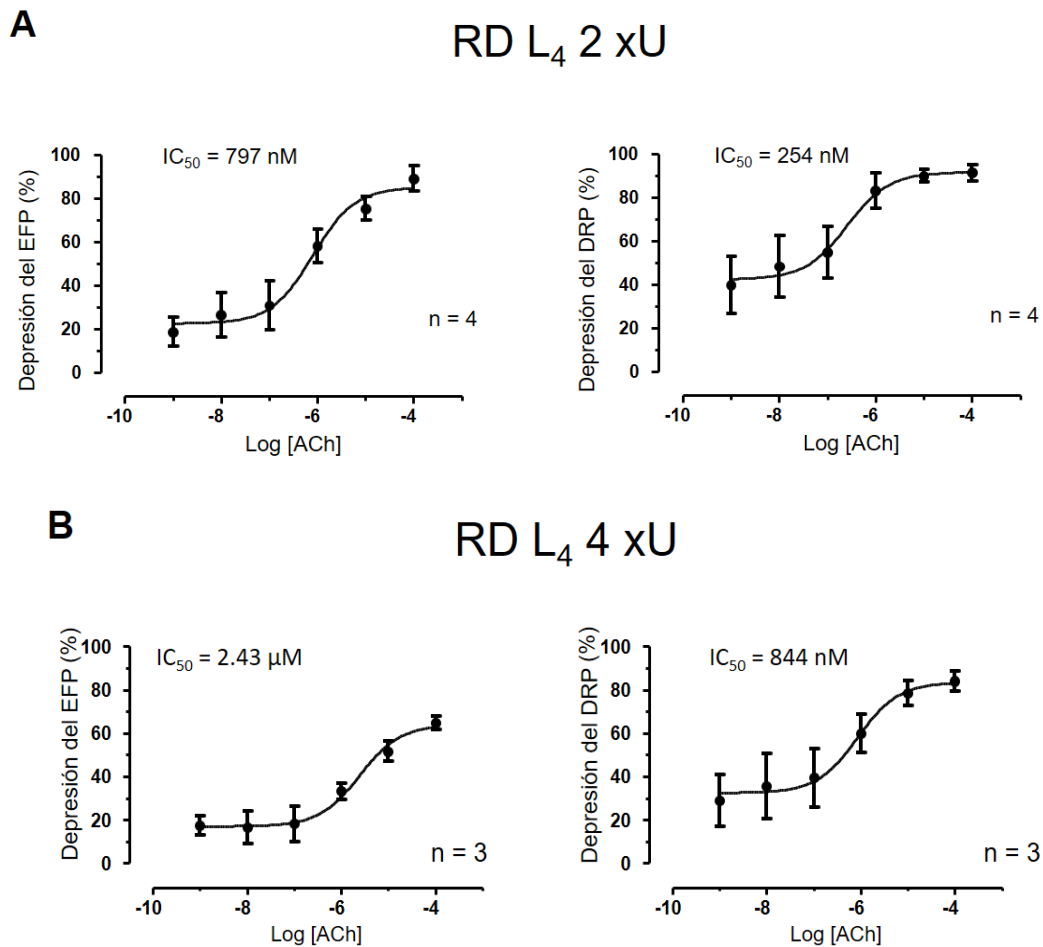


FIGURA 20. La ACh deprime los EFPs y DRPs de manera dependiente de la concentración. Curvas concentración-respuesta del efecto depresor de la ACh sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de la RD L₄ con una intensidad 2 xU (**A**) y 4 xU (**B**). Todos los experimentos se realizaron en presencia de neostigmina 20 μ M. En cada experimento, las mediciones se tomaron de los últimos 2 minutos previos a la aplicación de una nueva concentración.

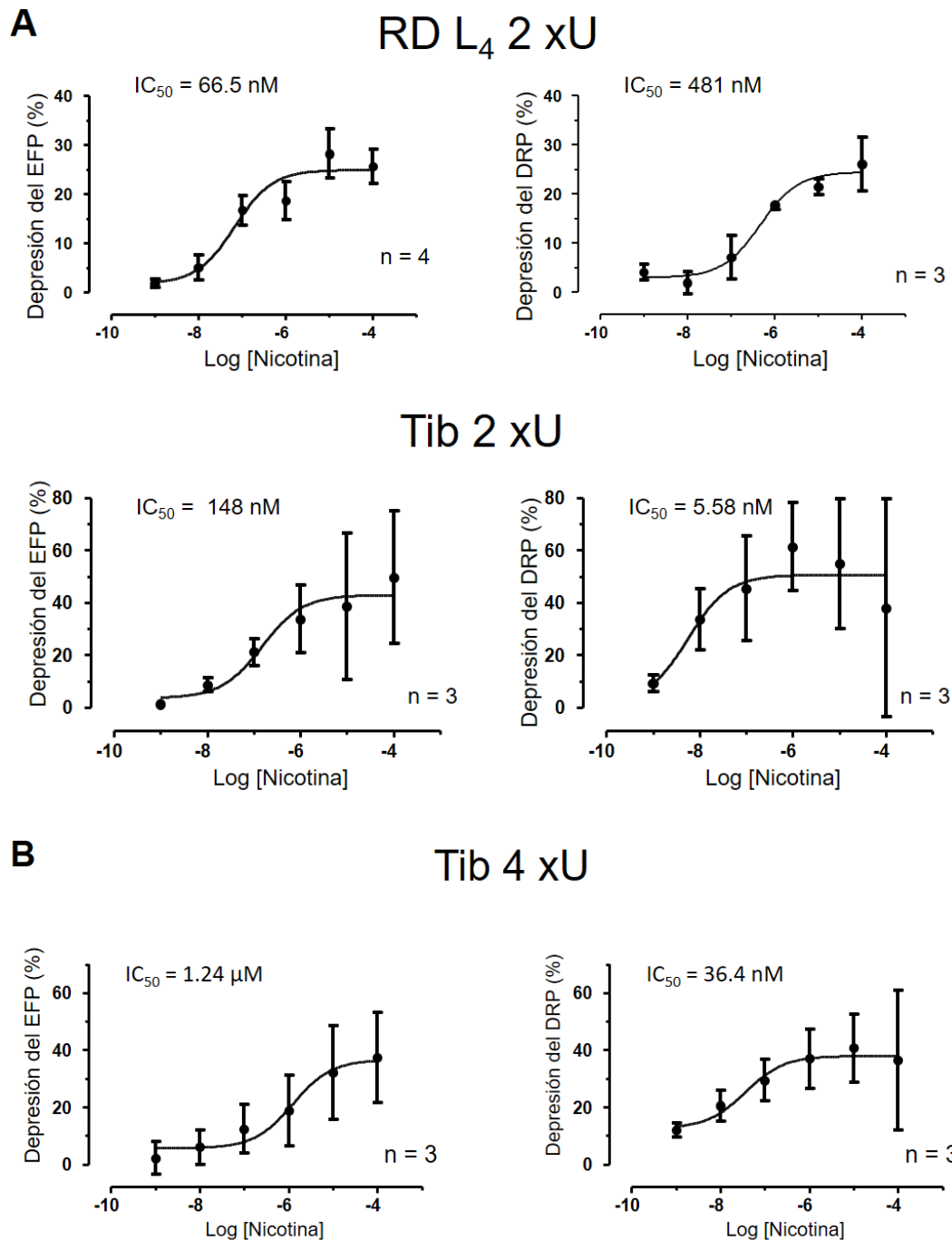


FIGURA 21. La nicotina deprime los EFPs y DRPs de manera dependiente de la concentración. **A.** Curvas concentración-respuesta del efecto depresor de la nicotina sobre los EFPs (lado izquierdo) y DRPs (lado derecho) producidos por la estimulación de la RD L₄ (arriba) o del nervio tibial (abajo) con una intensidad 2 xU. **B.** Curvas concentración-respuesta del efecto depresor de la nicotina sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio tibial a una intensidad de 4 xU. En cada experimento, las mediciones se tomaron de los últimos 2 minutos previos a la aplicación de una nueva concentración.

5.5. Efecto de la ACh y la nicotina en el potencial DC y la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral

Con el objetivo de determinar si la ACh y la nicotina modulan la excitabilidad de las fibras aferentes, se estudió el efecto de estas sustancias sobre el potencial DC registrado en la RD L₄. Las **figuras 22A** y **23A** muestran que ambos fármacos producen un potencial DC negativo (una despolarización) en las fibras aferentes a nivel de la RD L₄, lo cual se detecta también con el electrodo de registro de los EFPs. Es importante remarcar que la ACh y la nicotina inducen también un incremento de la actividad espontánea registrada en la RD (**figuras 22B** y **23B**). La despolarización inducida por la nicotina en el potencial DC registrado en la RD L₄ tuvo una amplitud promedio de aproximadamente 100 μ V (**figura 23C**).

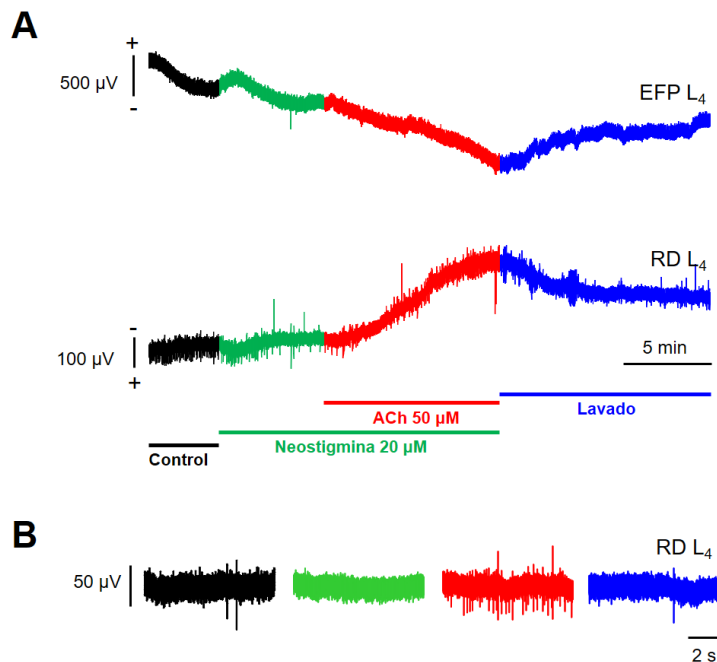


FIGURA 22. La ACh produce una despolarización sostenida de las fibras aferentes primarias. **A.** Potencial extracelular de campo (panel superior) y potencial DC en la RD L₄ (panel inferior) registrados de manera continua durante un experimento en condición control (negro), después de la aplicación de neostigmina 20 μ M (verde), tras la aplicación subsecuente de ACh 50 μ M (rojo) y después del lavado (azul). **B.** Potencial DC en la RD L₄ registrado durante las condiciones mostradas en A, pero con una mayor velocidad de barrido.

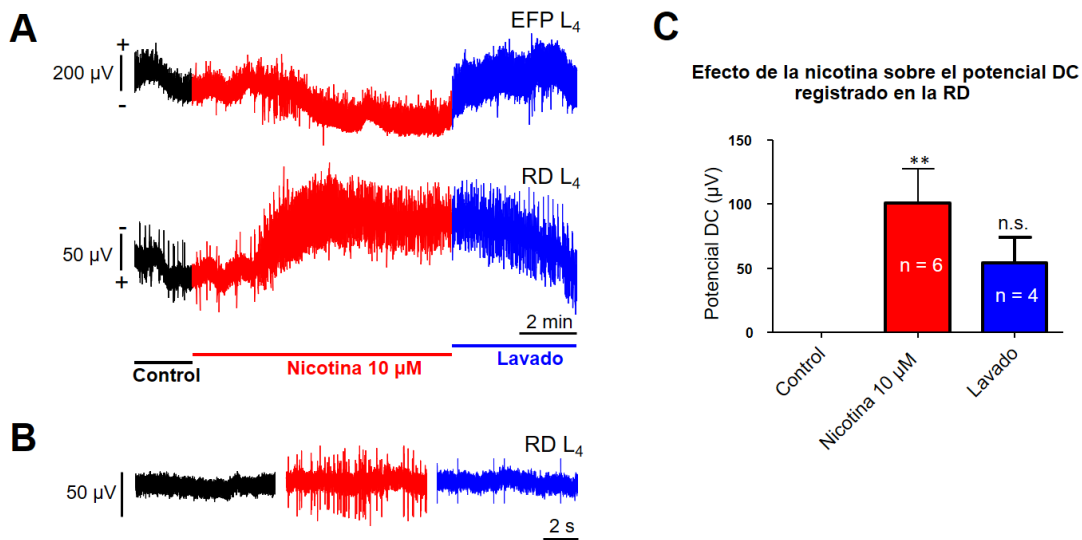


FIGURA 23. La nicotina produce una despolarización sostenida de las fibras aferentes primarias. **A.** Potencial extracelular de campo (panel superior) y potencial DC en la RD L₄ (panel inferior) registrados de manera continua durante un experimento en condición control (negro), después de la aplicación de nicotina 10 μM (rojo) y tras el lavado (azul). **B.** Potencial DC en la RD L₄ registrado durante las condiciones mostradas en A, pero con una mayor velocidad de barrido. **C.** Magnitud del efecto de la nicotina sobre el potencial DC registrado en la RD L₄. (n.s.) $p > 0.05$, ** $p < 0.01$. ANOVA de una vía, prueba de Dunnett.

De manera interesante, mediante la técnica de Wall, se observó que la ACh y la nicotina no modifican significativamente la amplitud del componente de mayor velocidad de conducción del PAC antidrómico producido por la microestimulación intraespinal con una intensidad submáxima (**figura 24**).

5.6. Efecto de la nicotina en la depresión homosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas

La inhibición prolongada producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas se conoce como depresión homosináptica y tiene un origen presináptico (Lev-Tov y Pinco, 1992). La **figura 25** muestra los registros de EFPs obtenidos con el protocolo de pulsos pareados en la

condición control para un intervalo de tiempo entre estímulos (IEE) de 50 ms. Este protocolo se repitió con diferentes IEEs (25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ms) con la finalidad de establecer el curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs. Los datos obtenidos se utilizaron para construir la gráfica de la **figura 26**, en la que puede apreciarse que la depresión homosináptica de los EFPs es máxima con un IEE de 25 ms, decae paulatinamente, y se prolonga hasta los 10 s.

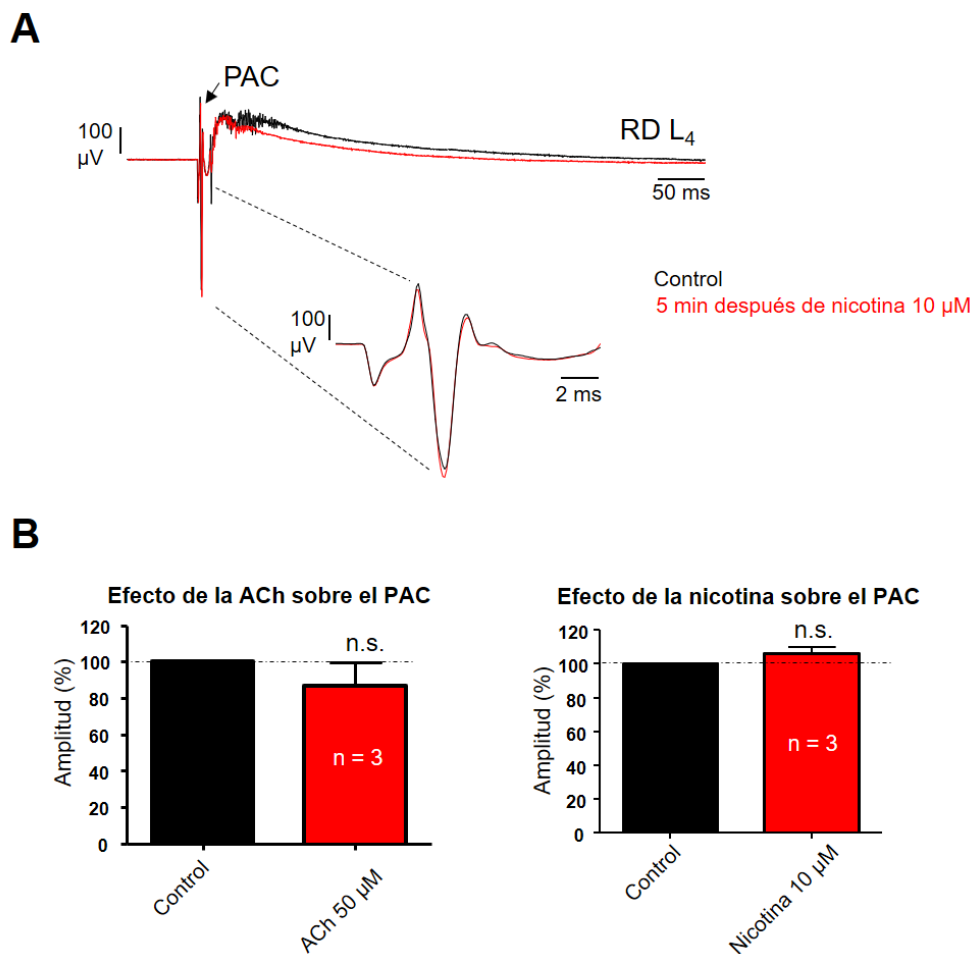


FIGURA 24. La ACh y la nicotina no afectan la amplitud del PAC antidrómico producido por la microestimulación intraespinal. A. Potencial de acción compuesto (PAC) y potencial de raíz dorsal (DRP) registrados en la RD L₄ después de la microestimulación intraespinal aplicada a una intensidad submáxima. *Inserto:* PAC mostrado con una mayor velocidad de barrido. **B.** Efecto de la ACh y la nicotina en la amplitud del PAC registrado en la RD L₄ después de la microestimulación intraespinal. (n.s.) $p > 0.05$, prueba t pareada.

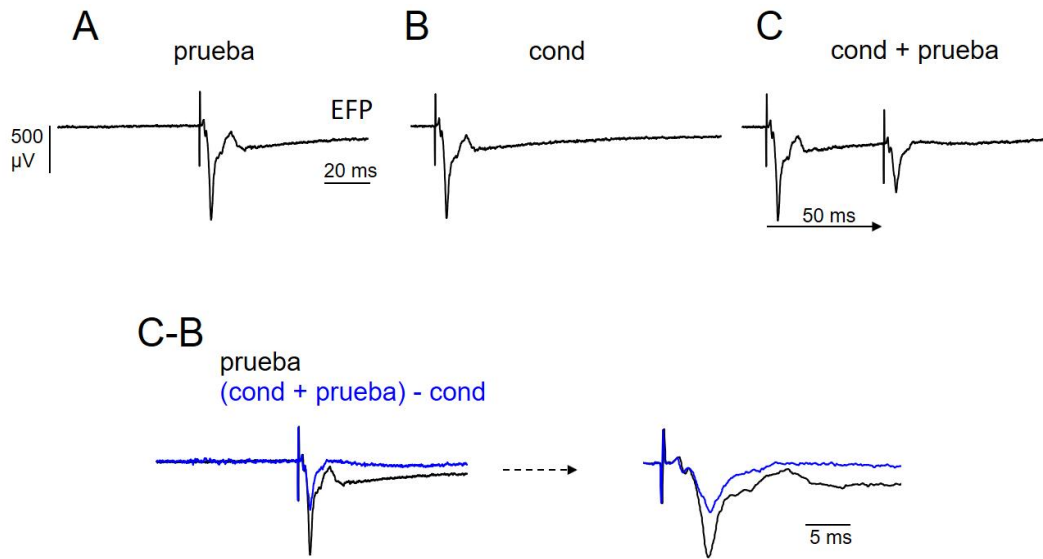


FIGURA 25. Depresión homosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas, con un IEE de 50 ms. A. EFPs producidos únicamente por el estímulo de prueba, aplicado en la RD L₄ con una intensidad 2 xU. **B.** EFPs producidos únicamente por el estímulo condicionante, aplicado en la misma raíz y con la misma intensidad. **C.** EFPs producidos por la aplicación del estímulo condicionante y el estímulo de prueba, con un intervalo de tiempo de 50 ms entre ambos estímulos. Si se resta el registro obtenido en B al registro obtenido en C se obtiene el efecto del estímulo condicionante sobre la estimulación de prueba (**C-B**, trazo azul). Al comparar los EFPs de la condición C-B con los producidos en la condición A, se observa una depresión, la cual se conoce como depresión homosináptica. En el panel derecho de C-B se muestran los registros con una mayor velocidad de barrido.

Una vez establecido el protocolo para estimar la depresión homosináptica de los EFPs en condiciones control, se procedió a investigar los efectos de la nicotina sobre dicha depresión mediante el mismo protocolo de pulsos pareados, a distintos IEE (**figura 27**).

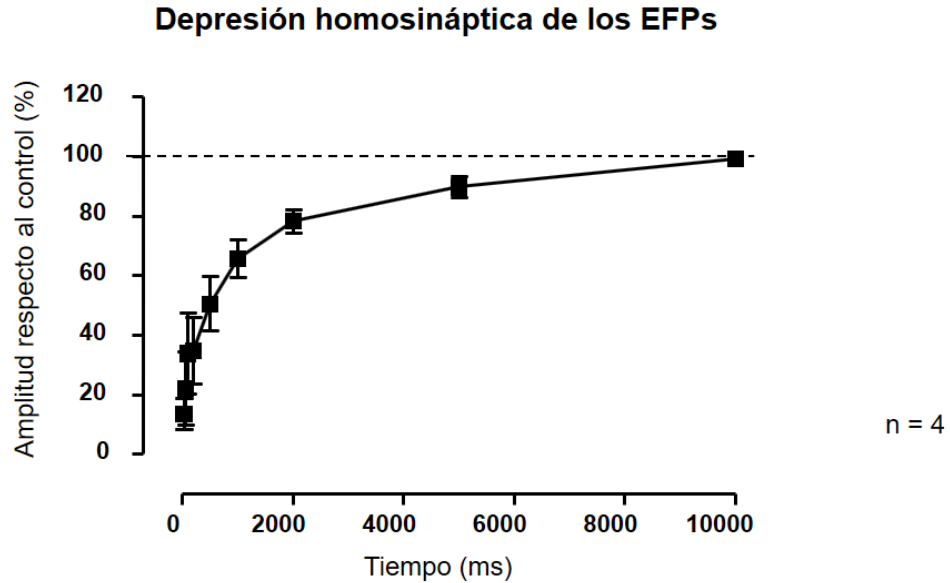


FIGURA 26. Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas. Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs producidos por la estimulación de la RD L₄ a una intensidad 2 xU en la condición control. Cada punto representa el promedio \pm E.E.M. de la amplitud de los EFPs.

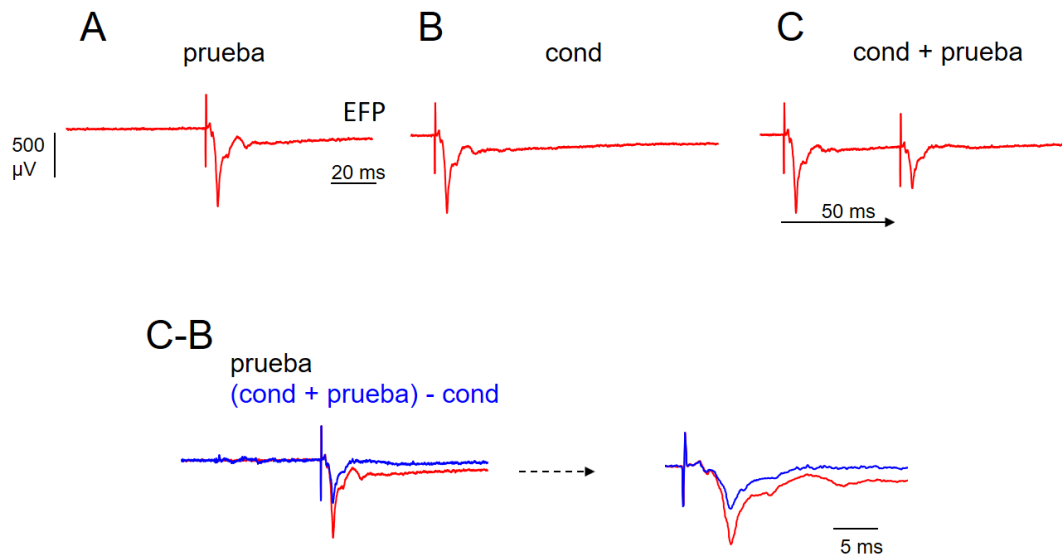


FIGURA 27. Depresión homosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas en presencia de nicotina, con un IEE de 50 ms. Mismo formato que la figura 25. Los registros fueron realizados en presencia de nicotina (10 μ M).

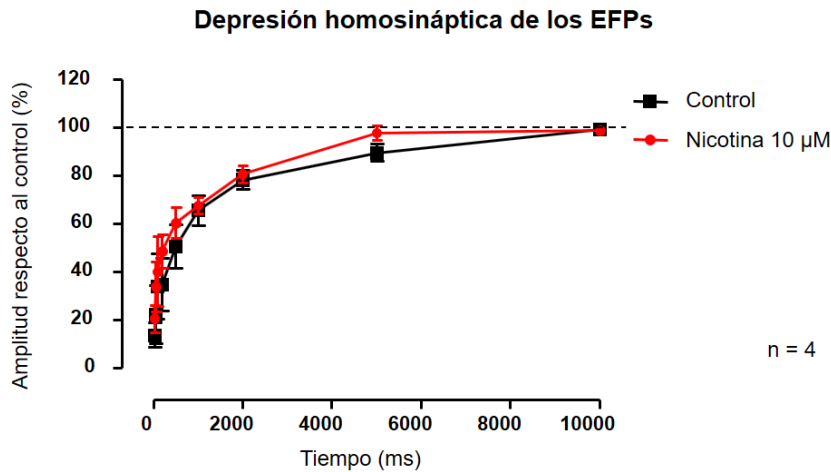


FIGURA 28. La nicotina no afecta la depresión homosináptica de los EFPs. Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs producidos por la estimulación de la RD L₄ a una intensidad 2 xU en condición control (cuadros negros) y en presencia de nicotina (círculos rojos). Cada punto representa el promedio ± E.E.M. de la amplitud de los EFPs. $p > 0.05$ ANOVA de dos vías, prueba de Bonferroni.

Es importante subrayar que los EFPs mostrados en la figura 27 fueron producidos en presencia de nicotina, por lo que ya se encuentran deprimidos por el efecto de la droga. La **figura 28** muestra el curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs producida en presencia de nicotina, superpuesta con el de la depresión homosináptica producida en la condición control. La nicotina no produjo un cambio estadísticamente significativo en la depresión homosináptica de los EFPs.

5.7. Efecto de la nicotina en la depresión heterosináptica de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes heterónimas

Para determinar si la nicotina modula las interneuronas que constituyen la vía que produce la PAD, se estudió su efecto sobre la depresión de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes heterónimas. El protocolo utilizado para estimar la depresión heterosináptica se llevó a cabo

de manera similar al de la depresión homosináptica, mediante la aplicación de pulsos pareados, y con diferentes IEEs. Sin embargo, en el protocolo de depresión heterosináptica, el estímulo condicionante se aplica en una RD diferente que el estímulo de prueba, por lo que el efecto depresor del primero sobre la respuesta al segundo se debe a la producción de PAD en fibras aferentes heterónimas (las fibras que producen PAD son diferentes de las que reciben PAD), quedando excluida de esta manera la intervención del fenómeno de depresión homosináptica.

La **figura 29** muestra el curso temporal de la depresión de los EFPs producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas, en la condición control y en presencia de nicotina. La nicotina no produjo un cambio estadísticamente significativo sobre la depresión heterosináptica de los EFPs ($p > 0.05$, ANOVA de dos vías, prueba de Bonferroni). Estos resultados sugieren que el efecto depresor de la nicotina sobre los DRPs se debe a la disminución de la transmisión sináptica de las fibras aferentes, pero no a una modulación de las interneuronas de los circuitos que producen la PAD.

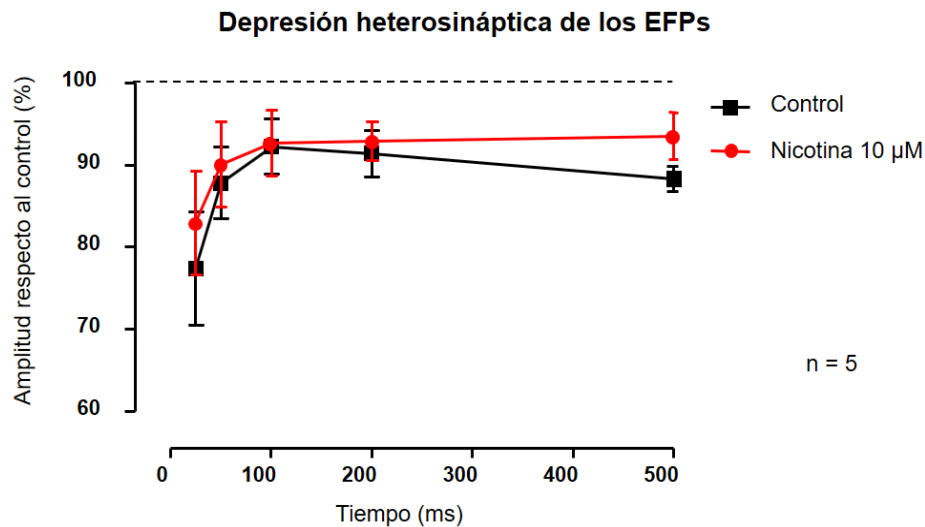


FIGURA 29. La nicotina no afecta la depresión heterosináptica de los EFPs. Curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs producidos en condición control (cuadros negros) y en presencia de nicotina (círculos rojos). Cada punto representa el promedio \pm E.E.M. de la amplitud de los EFPs.

5.8. Efecto de la nicotina en las corrientes monosinápticas excitadoras (EPSCs) producidas en neuronas del asta dorsal por la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas

A continuación, se procedió a determinar el efecto de la nicotina sobre las EPSCs monosinápticas evocadas en las neuronas del asta dorsal por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral de la RD L₄. Las corrientes fueron registradas en la modalidad de célula entera con un voltaje de mantenimiento de -70 mV, utilizando micropipetas que contenían QX-314 para bloquear los canales rápidos de sodio (corrientes de acción). Los registros se realizaron en presencia de mefenesina, la cual ha sido utilizada en varias especies para aislar componentes monosinápticos de la médula espinal (Wright, 1954; Lev-Tov y Pinco, 1992; Quinlan y Kiehn, 2007, Hochman et al., 2010; Shreckengost et al., 2010).

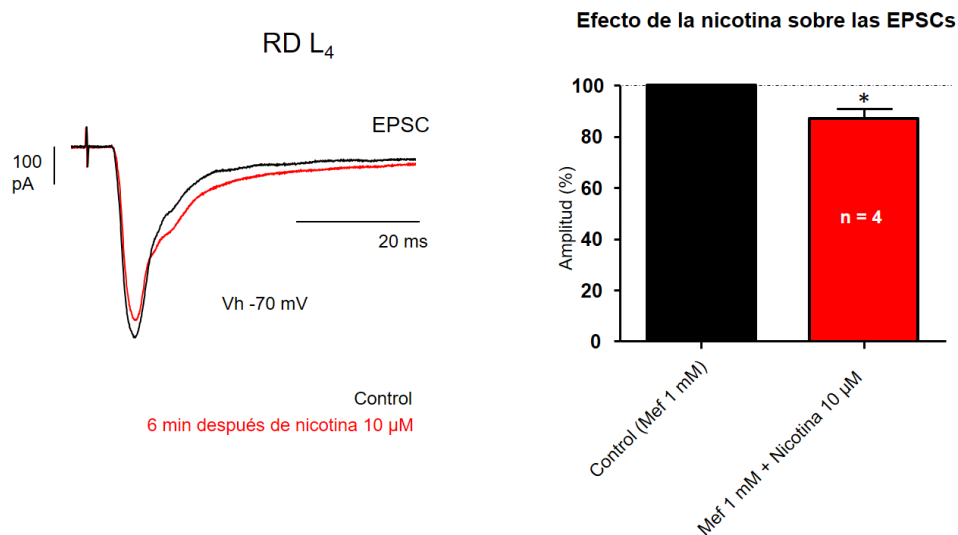


FIGURA 30. La nicotina disminuye las EPSCs monosinápticas producidas en las interneuronas del asta dorsal mediante la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral. *Lado izquierdo.* EPSCs producidas en una neurona del asta dorsal por la estimulación de la RD L₄ a una intensidad 2 xU en presencia de mefenesina (negro) y en presencia de mefenesina y nicotina (rojo). *Lado derecho.* Efecto de la nicotina sobre la amplitud de las EPSCs monosinápticas producidas en neuronas del asta dorsal por la estimulación de RD L₄ a una intensidad 2 xU. *p < 0.05, prueba t pareada.

La administración de nicotina produjo una disminución estadísticamente significativa de las EPSCs monosinápticas evocadas por la activación de las fibras aferentes de bajo umbral de la RD L₄, a aproximadamente un 86.9% del valor control (**figura 30**). Este hallazgo refleja una disminución de la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas producida por la nicotina, la cual coincide con la disminución de la amplitud de los EFPs evocados por la estimulación de Tib 2 xU y de RD L₄ 2 xU (**figuras 18 y 19**).

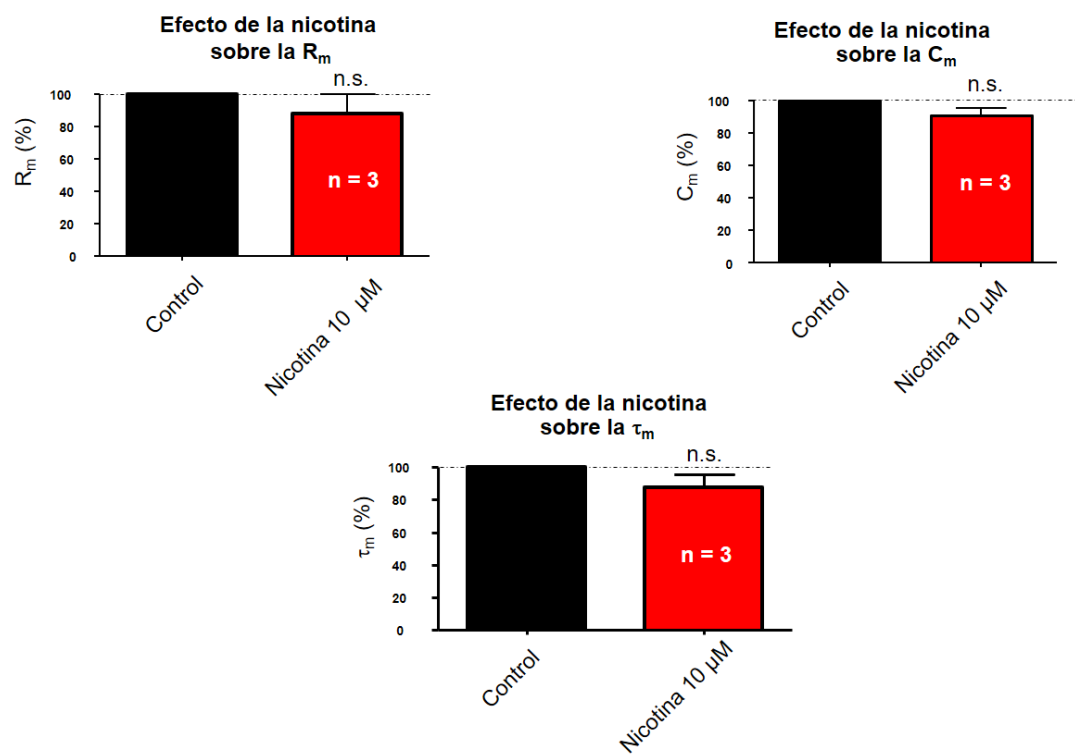


FIGURA 31. La nicotina no afecta las propiedades pasivas de membrana de las neuronas del asta dorsal. Efecto de la nicotina sobre la resistencia de membrana (R_m), la capacitancia (C_m) y la constante de tiempo (τ) de las interneuronas del asta dorsal profunda registradas en la modalidad de célula entera. Tanto las mediciones en la condición control como las mediciones bajo el efecto de nicotina se hicieron en presencia de mefenesina (1 mM). (n.s.) $p > 0.05$, prueba t pareada.

5.9. Efecto de la nicotina en las propiedades pasivas de las neuronas del asta dorsal

A fin de determinar el efecto de la nicotina sobre las propiedades pasivas de las interneuronas activadas de manera monosináptica por la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas, se midió la resistencia de membrana (R_m), la capacitancia de membrana (C_m) y la constante de tiempo (τ) en las neuronas del asta dorsal profunda registradas en la modalidad de célula entera en la condición control y en presencia de nicotina. La **figura 31** muestra que ninguna de estas propiedades fue modificada de manera significativa por la administración de nicotina, sugiriendo nuevamente que los efectos de esta droga están mediados por la activación de receptores presinápticos presentes en las fibras aferentes primarias y/o sus terminaciones, y no por la activación de receptores postsinápticos presentes en las interneuronas del asta dorsal.

6. Discusión

Consideraciones metodológicas

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de la ACh y la nicotina sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas de bajo umbral en una preparación de la médula espinal *in vitro* del ratón neonato. En comparación con las preparaciones *in vivo*, nuestro modelo nos ha permitido tener un control más preciso de las concentraciones alcanzadas por los fármacos utilizados. Además, en los estudios *in vivo* podría esperarse que el uso de anestésicos altere los mecanismos generadores de la PAD (Franks y Lieb, 1994; Krasowski y Harrison, 2000). Muchos estudios *in vivo* también se llevan a cabo en presencia de drogas paralizantes (por ejemplo, la galamina) que tienen como blanco a los nAChRs y que podrían por lo tanto afectar el estudio de la contribución de los nAChRs.

Con la finalidad de garantizar la estimulación selectiva de las fibras aferentes mielinizadas de bajo umbral, se registró el PAC en el extremo distal de la RD L₄ generado por la estimulación del extremo proximal. Con intensidades $\leq 2 \times U$ se registró únicamente el componente de mayor velocidad de conducción (**figura 15**), lo que permite asegurar que con dichas intensidades se reclutan solamente las fibras aferentes de bajo umbral, que corresponden a las fibras de los grupos I y II procedentes de los músculos y a las fibras cutáneas A β . Los componentes III y IV musculares y A δ y C cutáneos, que corresponden a las fibras de mayor umbral de activación y menor velocidad de conducción, únicamente se hacen evidentes con intensidades de estimulación mayores.

Para activar las fibras aferentes de bajo umbral se estimuló la RD L₄ completa o bien, el nervio tibial debido a sus dimensiones y a la facilidad de su disección. Sin embargo, estas estructuras son mixtas, ya que contienen fibras aferentes tanto cutáneas como musculares. Por lo tanto, para determinar si los efectos de la ACh y la nicotina sobre los EFPs y DRPs dependen del origen o

del diámetro de las fibras, sería necesario realizar experimentos en los que se estimulen nervios puramente cutáneos o musculares.

Los EFPs registrados a distintas profundidades exhiben diferentes amplitudes (**figura 14B**). En los diferentes experimentos realizados, los EFPs de mayor amplitud sirvieron como referencia electrofisiológica para identificar los sitios de las proyecciones intraespinales de las fibras aferentes de interés. Es importante mencionar que en nuestra preparación es difícil colocar la micropipeta con precisión en una lámina de Rexed determinada. La amplitud del componente monosináptico de los EFPs facilita la localización y el registro de interneuronas que reciben conexiones monosinápticas de las fibras aferentes de bajo umbral (experimentos de fijación de voltaje en la configuración de “célula entera”). Los sitios de registro de los EFPs de mayor amplitud también fueron considerados como referencia para medir la excitabilidad de las terminales de las fibras aferentes mediante la técnica de Wall.

Para el análisis estadístico de los diferentes experimentos realizados se consideraron datos normalizados. Sería conveniente realizar pruebas adicionales tomando en cuenta valores absolutos con la finalidad de corroborar la significancia estadística de los efectos de la ACh y la nicotina sobre los EFPs, DRPs, potenciales DC y excitabilidad de las fibras aferentes. En el mismo sentido, sería importante incrementar el número de experimentos como una perspectiva a largo plazo.

Participación de la ACh y los nAChRs en la modulación de las vías neuronales que producen la PAD

La depresión de los EFPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes mielinizadas en el nervio tibial o la RD L₄, inducida por la ACh y la nicotina (**figuras 17, 18 y 19**), indica una reducción de la transmisión sináptica de las fibras aferentes, probablemente por la activación de nAChRs

presinápticos. La nicotina además produjo una disminución de las EPSCs producidas por la activación monosináptica de las neuronas del asta dorsal profunda (**figura 30**); este hallazgo coincide con la disminución de los EFPs y sugiere asimismo una disminución de la transmisión sináptica entre las fibras aferentes mielinizadas y sus neuronas blanco en la médula espinal.

La ACh y la nicotina también deprimieron los DRPs registrados simultáneamente por la activación de las fibras aferentes de bajo umbral (**figuras 17, 18 y 19**). En el presente trabajo hemos aportado evidencia que indica que la depresión de los DRPs se debe a la reducción de la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas (ya que esto disminuye la activación de los circuitos espinales que producen la PAD), y no a la estimulación de nAChRs postsinápticos presentes en las interneuronas que median la PAD. Este concepto es apoyado por nuestros siguientes hallazgos: 1) la nicotina no modificó significativamente la depresión de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes heterónimas (**figura 29**), la cual depende de la activación de las vías neuronales que producen la PAD; 2) la nicotina no afectó las propiedades pasivas de las interneuronas del asta dorsal que reciben conexiones monosinápticas de las fibras aferentes mielinizadas (**figura 31**). Así, nuestros resultados sugieren que la ACh modula la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas mediante la activación de nAChRs presinápticos, localizados en las fibras aferentes primarias o en sus terminaciones intraespinales (**figura 32**).

Es importante resaltar que los DRPs producidos por la estimulación de las aferentes de bajo umbral se bloquean casi completamente con la aplicación de bicuculina 20 μ M, lo cual sugiere que son generados preponderantemente por la activación de receptores GABA_A sinápticos (resultados no mostrados). Se hace necesario evaluar el efecto de antagonistas de los nAChRs para investigar si existe un componente nicotínico. A este respecto, se ha demostrado que algunas interneuronas GABAérgicas coliberan ACh ([Todd,](#)

1991, Mesnage et al., 2011), que en teoría activaría también a los nAChRs presinápticos.

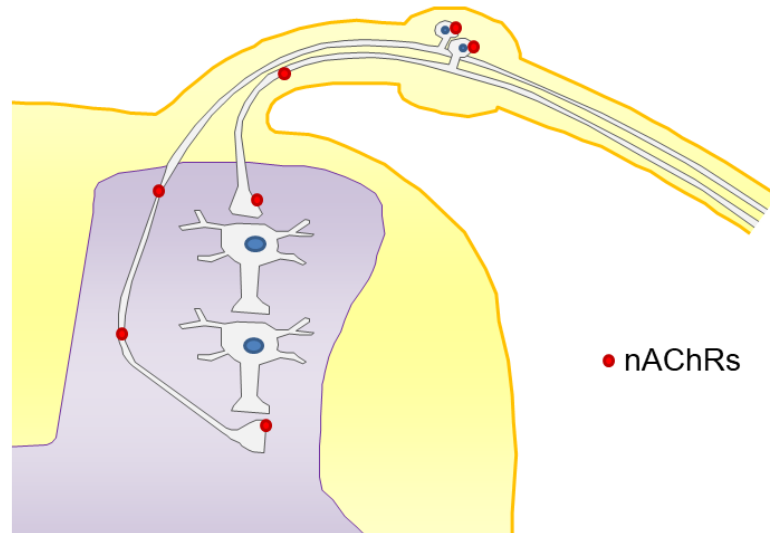


FIGURA 32. Posible distribución de los nAChRs que modulan la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas. La ACh modula la transmisión sináptica de las fibras aferentes primarias mediante la estimulación de nAChRs de localización presináptica. Por otro lado, nuestros resultados no apoyan una modulación colinérgica de las interneuronas que generan la PAD por medio de la activación de nAChRs.

Efectos de la ACh y la nicotina sobre la excitabilidad de las fibras aferentes primarias

La ACh y la nicotina indujeron una despolarización de las fibras aferentes, registrada como un potencial DC negativo (**figuras 22 y 23**). Estos resultados indican una activación de nAChRs presentes en las fibras aferentes (el potencial de inversión de la corriente a través de estos receptores es de aproximadamente 0 mV). No obstante, para demostrar que estos efectos de la ACh y la nicotina son directos sobre las fibras aferentes sería necesario bloquear la transmisión sináptica con TTX.

El efecto de la ACh y de la nicotina sobre la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral se estudió mediante la técnica de Wall. Con base en la despolarización de las fibras aferentes, registrada como un potencial DC negativo al aplicar ACh y nicotina (**figuras 22 y 23**), esperábamos que estas drogas produjeran una facilitación del PAC antidrómico producido por la microestimulación intraespinal. Sin embargo, ni la ACh ni la nicotina modificaron significativamente la amplitud del PAC (**figura 24**). Este hallazgo interesante sugiere que el aumento esperado en la excitabilidad de las fibras aferentes es contrarrestado por algún otro mecanismo. Como ha sido estudiado en el caso de la PAD tónica ([Loeza-Alcocer et al., 2013](#)), los mecanismos que generan una despolarización sostenida de las fibras aferentes podrían afectar la conducción de los potenciales de acción mediante un cortocircuito de membrana o mediante la inactivación de los canales iónicos involucrados en la generación de los potenciales de acción. Por lo tanto, es posible que, de manera similar, la activación de los nAChRs presinápticos produzca un cortocircuito y/o una inactivación de canales iónicos que interfiera con la conducción de los potenciales de acción en las fibras aferentes. Estos mecanismos explicarían asimismo la disminución de la transmisión sináptica de las fibras aferentes inducida por la ACh y la nicotina.

Los nAChRs no solamente son permeables a Na^+ y K^+ , sino también a otros cationes capaces de cruzar la región hidrofílica del poro abierto, incluyendo cationes divalentes (consúltese el trabajo de Dani, [2015](#)). Por lo tanto, la entrada de calcio a través de los nAChRs, con la subsecuente modulación de vías intracelulares de señalización, no debe descartarse como un posible mecanismo involucrado en los efectos observados de la ACh y la nicotina.

Adicionalmente, la nicotina no afectó significativamente la magnitud de la depresión de los EFPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas (**figura 28**). Estos resultados indican que la activación de nAChRs no modifica la depresión dependiente de frecuencia asociada a

una reducción de la disponibilidad de las vesículas sinápticas presentes en las terminaciones de las fibras aferentes primarias.

Naturaleza de los receptores involucrados en los efectos de la ACh y la nicotina

Las neuronas de los GRD de roedor expresan una amplia variedad de las subunidades de los nAChRs ([Genzen et al., 2001](#); [Lips et al., 2002](#); [Haberberger et al., 2004](#)). No obstante, a partir de nuestros resultados, es difícil establecer las subunidades específicas que constituyen a los nAChRs implicados en los efectos que hemos observado. Para una combinación específica de subunidades de los nAChRs, las EC_{50} reportadas en sistemas de expresión heteróloga no necesariamente son las mismas que las que podrían calcularse a partir de una preparación como la que hemos utilizado. No obstante, en el presente trabajo encontramos que la depresión de los EFPs y DRPs por la ACh y la nicotina ocurre con una potencia alta, ya que las IC_{50} se encuentran en el rango nanomolar o micromolar bajo, lo cual sugiere una alta afinidad de los ligandos por los receptores involucrados.

Resulta interesante que la depresión máxima de los EFPs y DRPs es mayor en el caso de la ACh en comparación con la nicotina; en otras palabras, la ACh deprime los EFPs y DRPs con una mayor eficacia (**figuras 20 y 21**). Esta diferencia podría ser explicada, al menos en parte, por las distintas afinidades con las que ambos ligandos se unen a los nAChRs involucrados. Nótese, por ejemplo, que la nicotina deprime los EFPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral con una IC_{50} menor que la ACh (**figuras 20 y 21**). Una mayor afinidad de la nicotina por los nAChRs favorecería la configuración del receptor en el estado desensibilizado, contribuyendo a la producción de una respuesta biológica menos eficaz. De acuerdo con esto, se ha mostrado que en diferentes combinaciones de subunidades de los nAChRs expresados en oocitos de *Xenopus sp.*, la ACh produce corrientes iónicas con una mayor eficacia pero con una menor afinidad que la nicotina ([Papke et al., 2007](#)).

La mayor eficacia de la ACh también podría deberse en parte a una activación de nAChRs que no son sensibles a la nicotina. Debe tenerse presente que la sensibilidad de estos receptores ante un ligando determinado depende de las subunidades que los constituyen. Por otro lado, nuestros resultados no descartan una posible modulación colinérgica de la transmisión sináptica de las fibras aferentes, o de las interneuronas que generan la PAD, producida por la activación de receptores muscarínicos.

Resta por efectuar una disección farmacológica de los efectos de la ACh y la nicotina sobre los EFPs, DRPs y cambios de DC, así como sobre las EPSCs y los EPSPs registrados en interneuronas del asta dorsal, utilizando diferentes ligandos de los nAChRs, para definir de manera más específica las diferentes subunidades de los nAChRs involucrados en la disminución de la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas.

7. Conclusiones

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la ACh inhibe la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas mediante la activación de nAChRs presentes a nivel presináptico, y que las interneuronas que generan la PAD parecen no expresar nAChRs. El efecto inhibitor sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes se debe posiblemente a una despolarización de las mismas, la cual daría lugar a un cortocircuito de membrana y/o a una inactivación de los canales iónicos involucrados en la propagación del potencial de acción, resultando en una disminución de la cantidad de neurotransmisor liberado. En investigaciones futuras, será importante establecer el papel fisiológico de la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas por la activación de receptores nicotínicos.

Perspectivas a largo plazo

- Incrementar el número de experimentos para examinar si los efectos de la ACh y la nicotina sobre los EFPs, DRPs, potenciales DC y excitabilidad de las fibras aferentes son estadísticamente significativos, así como para la determinación de las IC₅₀.
- Investigar los efectos de la ACh y la nicotina sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de nervios puramente cutáneos o musculares.
- Determinar si la despolarización producida por la ACh y la nicotina es directa sobre las fibras aferentes bloqueando la transmisión sináptica con TTX.
- Determinar los efectos de la ACh y la nicotina sobre las propiedades de disparo (relación *I-f*) de las interneuronas del asta dorsal.

- Efectuar una disección farmacológica de los efectos a nivel pre y postsináptico mediante la utilización de agonistas y antagonistas de las subunidades de los nAChRs reportadas en la médula espinal.
- Explorar si los nAChRs están tónicamente activos mediante la aplicación de diferentes antagonistas.

8. Referencias

1. Abramochkin DV, Nurullin LF, Borodinova AA, Tarasova NV, Sukhova GS, Nikolsky EE, Rosenshtraukh LV. (2010). Non-quantal release of acetylcholine from parasympathetic nerve terminals in the right atrium of rats. *Exp Physiol.* 95:265-73.
2. Alvarez, F.J. (1998). Anatomical basis for presynaptic inhibition of primary sensory fibers. In: *Presynaptic inhibition and neural control*. Rudomin P, Romo R, Mendell L (eds). Oxford University Press, New York. pp 13-49.
3. Alvarez-Leefmans FJ. (1990). Intracellular Cl⁻ regulation and synaptic inhibition in vertebrate and invertebrate neurons. In: *Chloride channels and carriers in nerve, muscle, and glial cells*. Alvarez-Leefmans FJ, Russell JM (eds). Plenum Press, New York. pp 109-158.
4. Alvarez-Leefmans FJ, Gamiño SM, Giraldez F, Noguerón I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J Physiol.* 406:225-46.
5. Alvarez-Leefmans FJ, Nani A, Marquez S. (1998). Chloride transport, osmotic balance, and presynaptic inhibition. In: *Presynaptic inhibition and neural control*. Rudomin P, Romo R, Mendell L (eds). Oxford University Press, New York. pp 50–79.
6. Ataka T, Kumamoto E, Shimoji K, Yoshimura M. (2000). Baclofen inhibits more effectively C-afferent than Adelta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Pain.* 86:273-82.
7. Bannatyne BA, Liu TT, Hammar I, Stecina K, Jankowska E, Maxwell DJ. (2009). Excitatory and inhibitory intermediate zone interneurons in pathways from feline group I and II afferents: differences in axonal projections and input. *J Physiol.* 587:379-99.
8. Bannon AW, Decker MW, Holladay MW, Curzon P, Donnelly-Roberts D, Puttfarcken PS, Bitner RS, Diaz A, Dickenson AH, Porsolt RD, Williams

- M, Arneric SP. (1998). Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science*. 279:77-81.
9. Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. (1984). The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol*. 229:329-46.
 10. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2007). The somatic sensory system. In: *Neuroscience Exploring the brain*. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins. pp 387-422.
 11. Bellier JP, Kimura H. (2007). Acetylcholine synthesis by choline acetyltransferase of a peripheral type as demonstrated in adult rat dorsal root ganglion. *J Neurochem*. 101:1607-18.
 12. Bellier JP, Kimura H. (2011). Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *J Chem Neuroanat*. 42:225-35.
 13. Brain KL. (2010). Parasympathetic cholinergic transmission, minus the vesicles. *Exp Physiol*. 95:263-4.
 14. Cattaert D, El Manira A. (1999). Shunting versus inactivation: analysis of presynaptic inhibitory mechanisms in primary afferents of the crayfish. *J Neurosci*. 19:6079-89.
 15. Dani JA. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol*. 124:3-19.
 16. Davidoff RA. (1972). Gamma-aminobutyric acid antagonism and presynaptic inhibition in the frog spinal cord. *Science*. 175:331-3.
 17. Decker MW, Meyer MD, Sullivan JP. (2001). The therapeutic potential of nicotinic acetylcholine receptor agonists for pain control. *Expert Opin Investig Drugs*. 10:1819-30.
 18. Désarménien M, Feltz P, Occhipinti G, Santangelo F, Schlichter R. (1984). Coexistence of GABAA and GABAB receptors on A delta and C primary afferents. *Br J Pharmacol*. 81:327-33.

19. Destombes J, Horcholle-Bossavit G, Simon M, Thiesson D. (1996). Gaba-like immunoreactive terminals on lumbar motoneurons of the adult cat. A quantitative ultrastructural study. *Neurosci Res.* 24:123-30.
20. Eccles JC, Eccles RM, Magni F. (1961). Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. *J Physiol.* 159:147-66.
21. Eccles JC, Kostyuk PG, Schmidt RF. (1962). Presynaptic inhibition of the central actions of flexor reflex afferents. *J Physiol.* 161:258-81.
22. Eccles JC, Schmidt R, Willis WD. (1963). Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J Physiol.* 168: 500–530.
23. Eguibar JR, Quevedo J, Jiménez I, Rudomin P. (1994). Selective cortical control of information flow through different intraspinal collaterals of the same muscle afferent fiber. *Brain Res.* 643:328-33.
24. Engelman HS, MacDermott AB. (2004). Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci.* 5:135-45.
25. Farkas S, Tarnawa I, Berzsenyi P. (1989). Effects of some centrally acting muscle relaxants on spinal root potentials: a comparative study. *Neuropharmacology.* 28:161-73.
26. Frank K, Fuortes M. (1957). Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. *Fed Proc.* 16, 39–40.
27. Franks NP, Lieb WR. (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature.* 367:607-14.
28. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K. (2017). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* 134:1-21.
29. Fung SI, Chan JY, Manzoni D, White SR, Lai YY, Strahlendorf HK, Zhuo H, Liu RH, Reddy VK, Barnes CD. (1994). Cotransmitter-mediated locus coeruleus action on motoneurons. *Brain Res Bull.* 35:423-32.

30. Fyffe RE, Light AR. (1984). The ultrastructure of group Ia afferent fiber synapses in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Brain Res.* 300:201-9.
31. García-Ramírez DL, Calvo JR, Hochman S, Quevedo JN. (2014). Serotonin, dopamine and noradrenaline adjust actions of myelinated afferents via modulation of presynaptic inhibition in the mouse spinal cord. *PLoS One.* 9(2).
32. Gardner EP, Johnson KO. (2013). The somatosensory system: receptors and central pathways. In: *Principles of neural science*. Fifth edition. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (eds). McGrawHill Medical. pp 475-497.
33. Genzen JR, Van Cleve W, McGehee DS. (2001). Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol.* 86:1773-82.
34. Glaum SR, Miller RJ, Hammond DL. (1994). Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 14:4965-71.
35. Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci.* 11:292-300.
36. Haberberger RV, Bernardini N, Kress M, Hartmann P, Lips KS, Kummer W. (2004). Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. *Auton Neurosci.* 113:32-42.
37. Hanada K, Kishimoto S, Bellier JP, Kimura H. (2013). Peripheral choline acetyltransferase in rat skin demonstrated by immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* 351:497-510.

38. Hochman S, Shreckengost J, Kimura H, Quevedo J. (2010). Presynaptic inhibition of primary afferents by depolarization: observations supporting nontraditional mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1198:140-52.
39. Hori Y, Endo K, Takahashi T. (1992). Presynaptic inhibitory action of enkephalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of rat spinal cord. *J Physiol.* 450:673-85.
40. Huang D, Huang S, Peers C, Du X, Zhang H, Gamper N. (2015). GABAB receptors inhibit low-voltage activated and high-voltage activated Ca(2+) channels in sensory neurons via distinct mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 465:188-93.
41. Hughes DI, Mackie M, Nagy GG, Riddell JS, Maxwell DJ, Szabó G, Erdélyi F, Veress G, Szucs P, Antal M, Todd AJ. (2005). P boutons in lamina IX of the rodent spinal cord express high levels of glutamic acid decarboxylase-65 and originate from cells in deep medial dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9038-43.
42. Jain KK. (2004). Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. *Curr Opin Investig Drugs.* 5:76-81.
43. Jankowska E, McCrea D, Rudomín P, Sykova E. (1981). Observations on neuronal pathways subserving primary afferent depolarization. *J Neurophysiol.* 46:506-16.
44. Jiménez I, Rudomin P, Solodkin M, Vyklicky L. (1983). Specific and potassium components in the depolarization of the Ia afferents in the spinal cord of the cat. *Brain Res.* 272:179-84.
45. Jiménez I, Rudomin P, Solodkin M. (1987). Mechanisms involved in the depolarization of cutaneous afferents produced by segmental and descending inputs in the cat spinal cord. *Exp Brain Res.* 69:195-207.
46. Jiménez I, Rudomin P, Enriquez M. (1991). Differential effects of (-)-baclofen on Ia and descending monosynaptic EPSPs. *Exp Brain Res.* 85:103-13.
47. Jones SL. (1991). Descending noradrenergic influences on pain. *Prog Brain Res.* 88:381-94.

48. Kanazawa I, Sutoo D, Oshima I, Saito S. (1979). Effect of transection on choline acetyltransferase, thyrotropin releasing hormone and substance P in the cat cervical cord. *Neurosci Lett.* 13:325-30.
49. Kawasaki Y, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M. (2003). Alpha 2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology.* 98:682-9.
50. Kawashima K, Fujii T. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci.* 106:167-73.
51. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 39:31-59.
52. Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. (1999). Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol.* 518:803-13.
53. Krasowski MD, Harrison NL. (2000). The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *Br J Pharmacol.* 129:731-43.
54. Kríz N, Syková E, Ujec E, Vyklický L. (1974). Changes of extracellular potassium concentration induced by neuronal activity in the spinal cord of the cat. *J Physiol.* 238:1-15.
55. Lamotte d'Incamps B, Destombes J, Thiesson D, Hellio R, Lasserre X, Kouchtir-Devanne N, Jami L, Zytnicki D. (1998). Indications for GABA-immunoreactive axo-axonic contacts on the intraspinal arborization of a Ib fiber in cat: a confocal microscope study. *J Neurosci.* 18:10030-6.
56. Lev-Tov A, Meyers DE, Burke RE. (1988). Activation of type B gamma-aminobutyric acid receptors in the intact mammalian spinal cord mimics the effects of reduced presynaptic Ca²⁺ influx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:5330-4.

57. Lev-Tov A, Pinco M. (1992). In vitro studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. *J Physiol.* 447:149-69.
58. Li P, Slaughter M. (2007). Glycine receptor subunit composition alters the action of GABA antagonists. *Vis Neurosci.* 24:513-21.
59. Lin Q, Li D, Xu X, Zou X, Fang L. (2007). Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. *Mol Pain.* 3:30.
60. Lips KS, Pfeil U, Kummer W. (2002). Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 115:1-5.
61. Loeza-Alcocer E, Canto-Bustos M, Aguilar J, González-Ramírez R, Felix R, Delgado-Lezama R. (2013). $\alpha(5)$ GABA(A) receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *J Neurophysiol.* 110:2175-84.
62. Lopez-Garcia JA, King AE. (1996). Pre- and post-synaptic actions of 5-hydroxytryptamine in the rat lumbar dorsal horn in vitro: implications for somatosensory transmission. *Eur J Neurosci.* 8:2188-97.
63. Lu Y, Doroshenko M, Lauzadis J, Kanjiya MP, Rebecchi MJ, Kaczocha M, Puopolo M. (2018). Presynaptic Inhibition of Primary Nociceptive Signals to Dorsal Horn Lamina I Neurons by Dopamine. *J Neurosci.* 38:8809-8821.
64. Lucas-Osma AM, Li Y, Lin S, Black S, Singla R, Fouad K, Fenrich KK, Bennett DJ. (2018). Extrasynaptic α_5 GABA_A receptors on proprioceptive afferents produce a tonic depolarization that modulates sodium channel function in the rat spinal cord. *J Neurophysiol.* 120:2953-2974.
65. Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H. (2007). Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. *Mol Pain.* 3:41.
66. Matsuo A, Bellier JP, Hisano T, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Saito N, Kimura H. (2005). Rat choline acetyltransferase of the peripheral type

differs from that of the common type in intracellular translocation. *Neurochem Int.* 46:423-33.

67. Maxwell DJ, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. (1995). Synaptic organization of excitatory and inhibitory boutons associated with spinal neurons which project through the dorsal columns of the cat. *Brain Res.* 676:103-12.
68. Maxwell DJ, Riddell JS. (1999). Axoaxonic synapses on terminals of group II muscle spindle afferent axons in the spinal cord of the cat. *Eur J Neurosci.* 11:2151-9.
69. Mesnage B, Gaillard S, Godin AG, Rodeau JL, Hammer M, Von Engelhardt J, Wiseman PW, De Koninck Y, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. (2011). Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord. *J Comp Neurol.* 519:3139-58.
70. Naguib M, Yaksh TL. (1994). Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems. *Anesthesiology.* 80:1338-48.
71. Ninkovic M, Hunt SP. (1983). Alpha-bungarotoxin binding sites on sensory neurones and their axonal transport in sensory afferents. *Brain Res.* 272:57-69.
72. Olave MJ, Puri N, Kerr R, Maxwell DJ. (2002). Myelinated and unmyelinated primary afferent axons form contacts with cholinergic interneurons in the spinal dorsal horn. *Exp Brain Res.* 145:448-56.
73. Papke RL, Dwoskin LP, Crooks PA. (2007). The pharmacological activity of nicotine and nornicotine on nAChRs subtypes: relevance to nicotine dependence and drug discovery. *J Neurochem.* 101:160-7.
74. Pawlowski SA, Gaillard S, Ghorayeb I, Ribeiro-da-Silva A, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. (2013). A novel population of cholinergic neurons in the macaque spinal dorsal horn of potential clinical relevance for pain therapy. *J Neurosci.* 33:3727-37.

75. Peng YY, Frank E. (1989). Activation of GABAB receptors causes presynaptic inhibition at synapses between muscle spindle afferents and motoneurons in the spinal cord of bullfrogs. *J Neurosci.* 9:1502-15.
76. Pierce JP, Mendell LM. (1993). Quantitative ultrastructure of Ia boutons in the ventral horn: scaling and positional relationships. *J Neurosci.* 13:4748-63.
77. Quinlan KA, Kiehn O. (2007). Segmental, synaptic actions of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *J Neurosci.* 27:6521-30.
78. Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. (1990). Choline acetyltransferase-immunoreactive profiles are presynaptic to primary sensory fibers in the rat superficial dorsal horn. *J Comp Neurol.* 295:370-84.
79. Rossignol S, Beloozerova IGJP, Dubuc R. (1998). Presynaptic mechanisms during locomotion. In: *Presynaptic Inhibition and Neural Control*. P. Rudomin, R. Romo, L. Mendell, Eds.: 385–97. Oxford University Press, New York.
80. Rothlin CV, Katz E, Verbitsky M, Elgoyhen AB. (1999). The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine, and type 3 serotonin receptors. *Mol Pharmacol.* 55:248-54.
81. Rudomin P, Schmidt RF. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res.* 129:1-37.
82. Rudomin P, Lomelí J, Quevedo J. (2004). Differential modulation of primary afferent depolarization of segmental and ascending intraspinal collaterals of single muscle afferents in the cat spinal cord. *Exp Brain Res.* 156:377-91.
83. Russo RE, Delgado-Lezama R, Hounsgaard J. (2000). Dorsal root potential produced by a TTX-insensitive micro-circuitry in the turtle spinal cord. *J Physiol.* 528:115-22.

84. Salio C, Merighi A, Bardoni R. (2017). GABA_B receptors-mediated tonic inhibition of glutamate release from A β fibers in rat laminae III/IV of the spinal cord dorsal horn. *Mol Pain*. 13:1744806917710041.
85. Schmidt RF. (1963). Pharmacological studies on the primary afferent depolarization of the toad spinal cord. *Pflügers Arch*. 277: 325-46.
86. Schmidt RF. (1971). Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system. *Ergeb Physiol*. 63:20-101.
87. Shefner JM, Buchthal F, Krarup C. (1992). Recurrent potentials in human peripheral sensory nerve: possible evidence of primary afferent depolarization of the spinal cord. *Muscle Nerve*. 15:1354-63.
88. Sherriff FE, Henderson Z, Morrison JF. (1991). Further evidence for the absence of a descending cholinergic projection from the brainstem to the spinal cord in the rat. *Neurosci Lett*. 128:52-6.
89. Shreckengost J, Calvo J, Quevedo J, Hochman S. (2010). Bicuculline-sensitive primary afferent depolarization remains after greatly restricting synaptic transmission in the mammalian spinal cord. *J Neurosci*. 30:5283-8.
90. Stornetta RL, Macon CJ, Nguyen TM, Coates MB, Guyenet PG. (2013). Cholinergic neurons in the mouse rostral ventrolateral medulla target sensory afferent areas. *Brain Struct Funct*. 218:455-75.
91. Tata AM, De Stefano ME, Tomassy GS, Vilaró MT, Levey AI, Biagioni S. (2004). Subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons express active vesicular acetylcholine transporter. *J Neurosci Res*. 75:194-202.
92. Todd AJ. (1991). Immunohistochemical evidence that acetylcholine and glycine exist in different populations of GABAergic neurons in lamina III of rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*. 44:741-6.
93. Tooyama I, Kimura H. (2000). A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. *J Chem Neuroanat*. 17:217-26.

94. Traiffort E, Ruat M, O'Regan S, Meunier FM. (2005). Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. *J Neurochem.* 92:1116-25.
95. Vijayaraghavan S, Karami A, Aeinehband S, Behbahani H, Grandien A, Nilsson B, Ekdahl KN, Lindblom RP, Piehl F, Darreh-Shori T. (2013). Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity- The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *PLoS One.* 8:e65936.
96. Walmsley B, Wieniawa-Narkiewicz E, Nicol MJ. (1987). Ultrastructural evidence related to presynaptic inhibition of primary muscle afferents in Clarke's column of the cat. *J Neurosci* 7:236–243.
97. Watson AH, Bazzaz AA. (2001). GABA and glycine-like immunoreactivity at axoaxonic synapses on 1a muscle afferent terminals in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol.* 433:335-48.
98. Willis WD Jr. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res.* 124:395-421.
99. Wright EB. (1954). Effect of mephenesin and other depressants on spinal cord transmission in frog and cat. *Am J Physiol.* 179:390-401.
100. Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. (2002). The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci.* 22:1010-9.
101. Zhang SJ, Jackson MB. (1995). GABA_A receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. *J Physiol.* 483:583-95.