



ARTÍCULO ORIGINAL

La oxitocina influye sobre la distribución en el marcaje retrógrado de dendritas de motoneuronas en ratas con lesión espinal

The oxytocin influences on the distribution in the dendrites retrograde labelling of motoneurons in spinal cord injury rats

**César Antonio Pérez Estudillo, María del Carmen Aguirre Torres, María Elena Hernández Aguilar
Luis Isauro García Hernández, Jorge Manzo Denes, Porfirio Carrillo Castilla**

Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana

*Pérez-Estudillo CA, Aguirre-Torres MC, Hernández-Aguilar ME,
García-Hernández LI, Manzo-Denes J, Carrillo-Castilla P.*

*La oxitocina influye sobre la distribución en el marcaje retrógrado
de dendritas de motoneuronas en ratas con lesión espinal.*

Rev Med UV 2007; 7(2): 12-21.

RESUMEN

Introducción: Previamente hemos utilizado a la peroxidasa de rábano (WGA-HRP) para identificar aspectos funcionales relacionados al transporte intracelular de sustancias en las motoneuronas espinales que inervan al músculo Pubococcígeo (Pc), el cual participa en la emisión seminal y la micción en la rata macho. Hemos demostrado el efecto de la manipulación de hormonas esteroides y de oxitocina (OT) sobre la tinción de motoneuronas, específicamente, la reducción de tales hormonas produce una disminución sobre la morfología de motoneuronas del Pc mientras que las hormonas aumentan la morfología. Aunque hemos observado que el área de arborización dendrítica de estas motoneuronas es dependiente de hormonas, aún no hemos analizado si existe una “morfología diferencial sensible” de sus dendritas dentro de la médula espinal dependiente de OT. **Objetivos:** Analizar las dendritas de las motoneuronas en las regiones del epéndimo, dorsolateral y ventral de la sustancia gris

de la médula espinal lumbosacra de ratas. **Material y métodos:** Ratas macho Wistar fueron agrupadas en: intactas; con lesión espinal tratadas con solución salina; y con lesión espinal tratadas con OT. Las motoneuronas fueron teñidas con WGA-HRP y se analizaron sus dendritas. **Resultados:** La lesión espinal redujo la longitud de las dendritas de las motoneuronas dirigidas hacia las tres regiones espinales. La OT restauró el daño producido por la lesión espinal. Las dendritas dirigidas hacia la región dorsolateral fueron significativamente más largas. **Conclusiones:** La OT promueve principalmente el transporte intracelular de sustancias en las dendritas de motoneuronas del Pc dirigidas hacia la región autonómica en la rata macho.

Palabras claves: Motoneuronas, Lesión de Médula Espinal, Oxitocina, Transporte Intracelular, Núcleo Paraventricular del Hipotálamo.

Recibido 25/07/2007 - Aceptado 14/12/2007

ABSTRACT

Introduction: We have previously used horseradish peroxidase (WGA-HRP) for determining functional aspects related to the intracellular transport of substances in motoneurons of the Pubococcygeus (Pc) muscle, which participates in seminal emission and micturition processes in male rats. We have described the effect of steroids and oxytocin (OT) manipulation on motoneurons staining, specifically, reduction of such hormones produce a decrease in the pattern of Pc motoneurons morphology whereas of hormones increase staining. Despite the fact that we have observed the area of dendritic arborization of these motoneurons is dependent on hormones, we however have not analyzed yet whether there is a “differential morphological sensitive” in their dendritic projections within the grey matter of spinal cord dependent on OT. **Objectives:** To test this hypothesis, we analyzed the dendrites of motoneurons in three regions: ventral, dorsolateral, and central canal of the sixth lumbar and the first sacral segments of the spinal cord of rats. **Materials and methods:** Wistar Male Rats were grouped in: intact; spinal injury treated with saline solution; and spinal injury treated with OT. The motoneurons were stained with WGA-HRP and their dendrites were analyzed. **Results:** Spinal cord injury diminished the length of primary dendrites in motoneurons projected to the three spinal regions. The OT restores the damage produced by spinal cord injury. Dendrites projecting to the dorsolateral area were significantly larger. **Conclusions:** The OT mainly promotes the activity in the intracellular transport of substances inside dendrites of Pc motoneurons projecting to autonomic region in the spinal cord of male rat.

Key words: Motoneurons, Spinal Cord Injury, Oxytocin, Intracellular Transport, Paraventricular Nucleus Hypothalamic.

INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Neurociencias del Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana, hemos demostrado que el músculo Pubococcígeo (Pc) es el de mayor tamaño de los que conforman a los músculos del piso pélvico, y que participa en los procesos de micción y de emisión seminal en la rata macho ⁽¹⁻⁴⁾. Sin embargo, a pesar de estos estudios, el músculo Pc ha recibido poca atención respecto a su participación en la fisiología del área pélvica, y también no han sido suficientemente estudiadas

las motoneuronas espinales que lo inervan. De este modo, para entender el papel que ejerce el músculo Pc en la fisiología de la reproducción del macho, hemos realizado estudios utilizando la técnica de marcaje retrógrado con una enzima conocida como peroxidasa de rábano conjugada con la aglutinina de germen de trigo (WGA-HRP, por sus siglas en inglés), analizando la morfología de las motoneuronas que inervan al Pc, para detectar la dependencia de estas neuronas a la fluctuación de las hormonas esteroides y péptidos. La WGA-HRP es capturada por endocitosis en las terminaciones nerviosas de la unión neuromuscular y transportada retrógradamente (*transporte axónico rápido*, aproximadamente 400 mm/día) hasta el cuerpo celular de la neurona, donde puede llevarse a cabo la reacción con una sustancia conocida como tetrametilbenzidina, con la consecuente coloración de la célula ⁽⁵⁾. Esta técnica histológica es importante porque, además de mostrarnos un dato morfológico por la misma tinción de la célula, sugerimos que podría representarnos el estado funcional de la célula. Es decir, proponemos que la tinción intracelular sirve para indicar la actividad de la neurona y que esta actividad refleja el transporte de la enzima en el citoplasma de la motoneurona.

Así, hemos observado que las motoneuronas del músculo Pc están localizadas en el núcleo ventral de la lámina IX de la médula espinal, en el segmento lumbar 6 y principalmente en el segmento sacro 1 ⁽⁶⁾. La castración disminuye parámetros morfológicos como el área del soma y el área de arborización de dendritas en las motoneuronas y el tratamiento con testosterona y estradiol (esta hormona de forma más rápida) revierten estos efectos. Los efectos producidos por la castración en las motoneuronas del Pc se asemejan a aquellos producidos en otras motoneuronas involucradas en la erección peniana, como las del Núcleo Espinal del Bulboespongioso (SNB, por sus siglas en inglés). Las motoneuronas del SNB están localizadas en los segmentos espinales lumbar 5 y 6, e inervan a músculos estriados en la base del pene de la rata macho ^(7,8).

Se han propuesto principalmente dos hipótesis para explicar los efectos en la morfología: en la primera hipótesis, se señala que los cambios en los niveles de andrógenos se asocian con alteraciones significativas en la estructura y función de estas neuronas en la etapa adulta ⁽⁸⁾;

y en la segunda hipótesis, se propone que el andrógeno parece afectar la velocidad o cantidad de transporte de materiales desde los músculos inyectados al soma de las motoneuronas del SNB, o bien, del soma de las motoneuronas a las dendritas ⁽⁹⁾.

La segunda hipótesis está apoyada en un estudio realizado por iontoforésis intracelular con peroxidasa de rábano en el que se mostró que no hay diferencias significativas en cuanto al número y la longitud de las dendritas del SNB de ratas intactas y castradas. El efecto podría ser principalmente en el transporte de la HRP, pero no existe una fuerte evidencia de que los andrógenos causan alteraciones crónicas en la estructura de las dendritas del SNB en ratas macho adultas. Esto nos hace suponer, que los efectos que observamos en nuestros estudios previos por la manipulación de la testosterona representan la distribución de la peroxidasa de rábano dentro del citoplasma de la neurona pero no el tamaño completo de la neurona teñida.

Así, proponemos que el efecto del estradiol manifiesta que la aromatización de la testosterona (es decir, la conversión de testosterona a estradiol) parece ser un proceso fisiológico importante para la adecuada función de las motoneuronas del músculo Pc en el sistema nervioso central de ratas macho. Sin embargo, en la actualidad desconocemos si las motoneuronas de este músculo tienen aromatasas en su citoplasma, pero se debe considerar que ya se ha reportado que la médula espinal no muestra actividad de aromatasas y carece de receptores a estradiol ⁽¹⁰⁾. Si esto es cierto, entonces el estrógeno influiría indirectamente en el sistema de transporte intracelular de sustancias a través de la actividad indirecta de neuronas supraespinales, como las neuronas del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (PVN, por sus siglas en inglés), y que esta influencia sería a través de la oxitocina (OT) liberada como mensajero sobre las motoneuronas.

Esta propuesta está basada en estudios en donde reportan que neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo proyectan al SNB ⁽¹¹⁻¹³⁾, y que estas neuronas hipotalámicas contienen receptores a estradiol y aromatasas ⁽¹⁴⁾. Nosotros proponemos que además de la proyección de neuronas hipotalámicas a la región en donde se encuentran las motoneuronas del SNB, también se proyectarían a la región donde se encuentran las motoneuronas del Pc.

Cabe señalar que el PVN del hipotálamo parece ser el principal portador de sustancias peptídicas como la OT hacia la médula espinal ya que se ha observado que una lesión electrolítica del PVN disminuye dramáticamente los niveles de OT y las fibras inmunorreactivas oxitocinérgicas en la médula espinal ^(15;16).

Así, hemos mostrado la influencia del PVN sobre el transporte intracelular de sustancias en motoneuronas espinales dependientes de andrógenos en la rata, en el que utilizamos machos intactos a los que introducimos una cánula en el PVN y fueron tratados con bloqueadores de receptores a andrógenos (AR), a estrógenos (ER), y del complejo enzimático de aromatasas (Aro). Este estudio mostró que la morfología de las motoneuronas del Pc se encuentra significativamente disminuida de forma similar a los machos castrados. Además en esta investigación se mostró que en ratas castradas, la administración intratecal de OT sobre la médula espinal lumbosacra produce un aumento significativo en la morfología de las motoneuronas sobre los valores obtenidos a un animal castrado y sin tratamiento, aunque estos valores no alcanzan al de los intactos ⁽¹⁷⁾.

Así, en nuestro laboratorio proponemos la existencia de una *conexión paraventricular-espinal* en el macho, en el que la OT influiría en el sistema de transporte de sustancias de las motoneuronas lumbosacras, a través del siguiente mecanismo: neuronas del PVN, envían sus axones a las motoneuronas del músculo Pc. Así, estas neuronas supraespinales capturan a la testosterona que se encuentra a nivel sistémico convirtiéndola a estradiol por medio de las aromatasas, y liberando en esta conversión a mensajeros de tipo peptídico como son la OT para promover el transporte intracelular de sustancias durante la función de las motoneuronas del Pc en los procesos de micción y de emisión seminal.

En estas mismas investigaciones, analizamos el efecto producido por la espinalización (interrupción de la comunicación paraventricular-espinal) sobre la morfología de motoneuronas del Pc en grupos de ratas macho con 2, 4 y 6 semanas de evolución después de la sección completa transversal de la médula espinal a nivel medio torácico (T8). Los datos mostraron que la lesión espinal por dos o más semanas produce una disminución significativa en

los parámetros morfológicos de las motoneuronas teñidas con WGA-HRP. Suponemos que los efectos observados por la lesión espinal fueron representados por alteraciones en la distribución intracelular de peroxidasa de rábano, como hemos propuesto anteriormente en el estudio de las ratas castradas ⁽¹⁷⁾. De esta forma, la lesión de la médula espinal (ablación de estos axones descendentes del PVN por la sección transversal completa) ejerció un efecto en el circuito paraventricular-espinal.

Así mismo, mostramos la influencia de la oxitocina intratecal en la morfología de las motoneuronas del Pc de animales con lesión espinal, en donde se observó que el péptido induce un aumento en el área del soma y área de arborización de dendritas de las motoneuronas, de tal forma que éstas se comportaron similares a las neuronas de los animales intactos de la médula espinal ⁽¹⁷⁾. Estos estudios nos sugieren la posible conexión entre axones descendentes del PVN y las motoneuronas lumbosacras, a través de mensajeros de tipo peptídico como la OT. Sin embargo, se ha reportado que no hay receptores a OT en la región ventral donde están localizadas las motoneuronas del Pc ⁽¹⁸⁾. Entonces, con los resultados obtenidos de nuestros estudios proponemos que las motoneuronas podrían tener dendritas más largas que lleguen hasta las regiones donde están localizados los receptores a OT en la médula espinal en la rata. De esta forma, las dendritas de las motoneuronas del Pc podrían tener receptores a OT y este péptido supraespinal ejercería el efecto directo sobre éstas células espinales. Lo que no sabemos es si esta influencia peptídica es de forma homogénea para todas las dendritas de las motoneuronas en las regiones dentro de la sustancia gris de la médula donde están proyectadas.

Por lo tanto, aunque hemos analizado la influencia de la OT sobre el área de la arborización dendrítica de modo grueso de estas motoneuronas, no hemos realizado un análisis sistemático sobre la posible existencia de una “morfología diferencial sensible” en el transporte intracelular de sustancias de sus proyecciones dendríticas dentro de la sustancia gris en los segmentos lumbosacros donde están localizadas. De esta manera, en la presente investigación nos surgió el interés por analizar las dendritas de las motoneuronas que proyectan a las regiones del epéndimo, dorsolateral y ventral de la sustancia gris de la

médula espinal lumbosacra de ratas macho.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tres grupos de ratas macho de la cepa Wistar (n=8 en cada grupo) con un peso de 250-350 gr. Se mantuvieron en jaulas de acrílico colectivas (50x30x20 cm; 4 animales por jaula), previamente acondicionadas con una cama de aserrín. Las jaulas estuvieron en un bioterio mantenido a temperatura constante 23±2 °C, con un ciclo invertido luz-oscuridad de 12:12 hr (encendido de la luz, 20:00 hrs). El agua y el alimento (Nutricubos para roedores, Purina, México) se les proporcionó *ad libitum*.

Las ratas estuvieron agrupadas de la siguiente manera:

- Intactas de la médula espinal y durante 4 semanas con implante intratecal (grupo control # 1; Ctr 1).
- Con 2 semanas de lesión espinal (o también conocidos como espinalizados), implante intratecal-minibomba Alzet la cual contuvo solución salina (grupo control # 2; Ctr 2) durante otras 2 semanas.
- Con 2 semanas de lesión espinal y tratadas durante 2 semanas con oxitocina (TxO).

Se utilizó oxitocina (SIGMA, T-2899; TYR-PRO-LEU-GLY AMIDE; [Tyr⁶] – Oxytocin fragment 6–9) para la administración intratecal (236 µl aproximadamente de volumen total por animal a una concentración de 10 µM).

La peroxidasa de rábano utilizada fue la siguiente: SIGMA (L-3892), *Lectin from Triticum vulgaris (wheat germ)*, peroxidase labeled.

Cada cirugía y manipulación de las ratas fue guiada de acuerdo al Manual sobre Uso de Animales para Investigación en Neurociencias creado por la Sociedad de Neurociencias (U.S.A.). Así, a los tres grupos se les implantó un tubo de polietileno intratecalmente (región de la nuca del cuello), después de 3 días de recuperación motora normal, a las ratas se les realizó una sección completa transversal de la médula espinal torácica en T8, excepto al grupo de los intactos, quienes solo estuvieron implantados intratecalmente. Las ratas recibieron por vía intramuscular metamizol sódico (130 mg/kg) como analgésico para después de la cirugía, y benzilpenicilina (40 000 UI/rata) para prevenir infecciones. Tres veces al

día durante los primeros 10 días después de la lesión, a los espinalizados se les vaciaron manualmente la vejiga ya que presentaron arreflexia por el choque espinal debido al daño producido y también se le limpiaron la región anogenital con benzal al 50% para evitar infecciones de la piel. Al siguiente día después de la lesión, a los machos espinalizados les fue conectada subcutáneamente en la parte externa final del tubo una minibomba osmótica Alzet (Model 2002, ALZA corporation). Este modelo de minibomba está fabricado para liberar constantemente por dos semanas 0.5 μ l/hr del fármaco, en este caso de solución salina o de oxitocina (10 μ M). Al grupo de intactos no recibió ningún tratamiento del fármaco. Después de dos semanas de tratamiento, las motoneuronas del músculo Pc fueron marcadas retrógradamente con WGA-HRP en ambos lados de la médula espinal del sujeto, 40 horas después se sacrificaron a los machos, se les realizó una perfusión transcardiaca, luego se les extrajo la médula espinal lumbosacra. Al tercer día, al tejido se le hicieron cortes de 40 μ m de grosor y se mantuvieron en flotación con un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, después de 24 horas, estos cortes fueron colocados en portaobjetos y fueron teñidos por el método de la tetrametilbenzidina con una contratinción de rojo neutro, para finalizar en el montaje de cubreobjetos. Posteriormente, el análisis de los parámetros morfológicos fue realizado únicamente en aquellas motoneuronas marcadas en donde se encontraron bien definidas su soma y dendritas y se excluyeron aquellas células cuyo soma y dendritas se solapaban, como en el caso de agrupaciones (clusters) de células, por lo común son agrupaciones de más de 4 neuronas en un mismo corte, en el que es difícil distinguir el origen y terminación de las dendritas. Este análisis fue *unilateral*, por lo que se consideró el lado con el mejor marcaje de neuronas. Además, como hemos observado en estudios previos, las motoneuronas del músculo pubococcígeo presentan una distribución de sus dendritas principalmente hacia tres regiones dorsomedial, dorsolateral y ventral de la médula espinal. Estas observaciones dieron origen al planteamiento de un efecto por cada grupo de tratamiento sobre el transporte intracelular y que resultaría en un “tinción diferencial” de la longitud de dendritas primarias de las regiones antes mencionadas. Para su análisis, las

motoneuronas del músculo Pc marcadas o teñidas fueron divididas en tres cuadrantes: las que proyectaron con dirección hacia la región dorsolateral, hacia la región del epéndimo y hacia la región ventral. Los números obtenidos del análisis morfológico fueron colocados en el paquete estadístico GB-STAT para Windows. A estos valores se les realizó el análisis de varianza de una vía, para la comparación intergrupar. Se consideró la diferencia significativa cuando el valor F resultó en $p < 0.01$, las diferencias particulares fueron detectadas con la prueba post hoc de Dunnet.

RESULTADOS

Las dendritas de las motoneuronas del músculo Pubococcígeo teñidas individualmente o en clusters estuvieron proyectadas hacia las regiones dorsolateral (RDL), epéndimo (RE) y ventral (RV) de la sustancia gris de la médula espinal en todos los grupos utilizados en las ratas (Fig. 1). La tinción con el trazador de HRP demostró que la RDL y la RE mostraron las dendritas más largas en comparación a la RV.

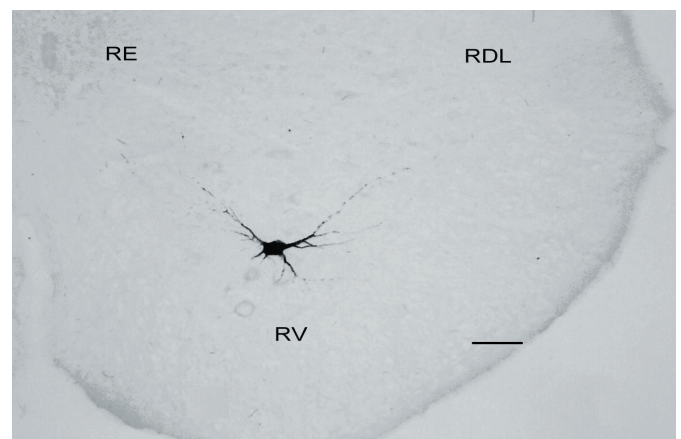


Fig 1. Corte transversal unilateral de una motoneurona que inerva al músculo Pubococcígeo de la médula espinal en una rata macho intacta. Las dendritas de las motoneuronas fueron marcadas con WGA-HRP dirigidas hacia la región dorsolateral (RDL), región del epéndimo (RE) y región ventral (RV). La línea negra indica 50 μ m de longitud.

La lesión de médula espinal disminuyó la longitud de las dendritas primarias hacia las 3 regiones donde están proyectadas. Por otro lado, la oxitocina restauró la longitud de las dendritas de los animales espinalizados en las tres regiones pero de forma significativa en la dorsolateral, incluso éstos valores superaron los valores de los intactos. El análisis estadístico mostró los siguientes valores:

región dorsolateral [$F(2,734) = 27.33$; $p < 0.01$], región del epéndimo [$F(2,627) = 13.39$; $p < 0.01$] y región ventral [$F(2,1005) = 12.01$; $p < 0.01$].

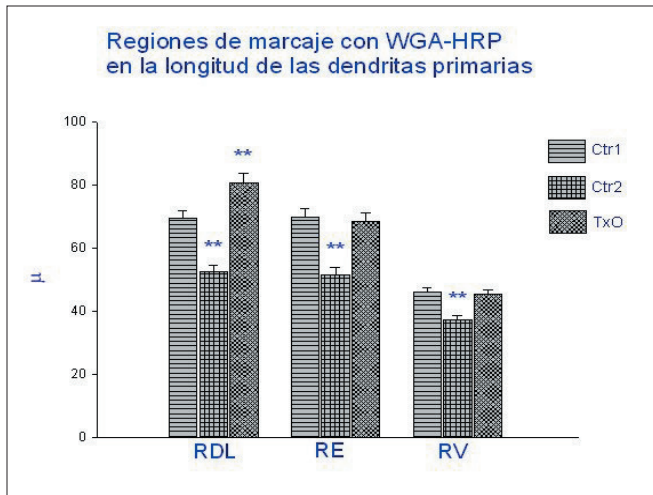


Fig 2. Representación gráfica de los valores obtenidos en la "tinción morfológica diferencial" de dendritas primarias de la región dorsolateral (RDL), región del epéndimo (RE) y región ventral (RV) de las motoneuronas que inervan al músculo Pc. Las barras representan la media + el error estándar en los grupos de machos con implante intratecal (Ctr 1); machos con médula espinal lesionada con implante intratecal-minibomba Alzet y con tratamiento de solución salina (Ctr 2), y de machos espinalizados con tratamiento de oxitocina (TxO). ANOVA de una Vía, ** $p < 0.01$

En la figura 3 se muestra el análisis del número de dendritas marcadas o teñidas con WGA-HRP de las motoneuronas del músculo Pc hacia la RDL, RE, y RV en cada grupo de tratamiento. En este parámetro la RV siempre fue mayor en las tres condiciones. Además, se pudo observar que el tratamiento con OT genera un mayor número de dendritas marcadas de la RV en comparación a la RDL.

En la figura 4 se muestra el análisis del porcentaje de dendritas marcadas con WGA-HRP de las motoneuronas del músculo Pc hacia la RDL, RE, y RV en cada grupo de tratamiento. Los valores demostraron que el grupo de animales espinalizados y tratados con solución salina (Ctr 2) presentaron un menor número de dendritas dirigidas hacia las tres regiones en comparación con el número de dendritas de los otros dos grupos. Se debe considerar que se observó independientemente del grupo de tratamiento, en la región ventral siempre fue superior (aproximadamente el 40%) en comparación con las otras dos regiones (cada una con aproximadamente el 30%).

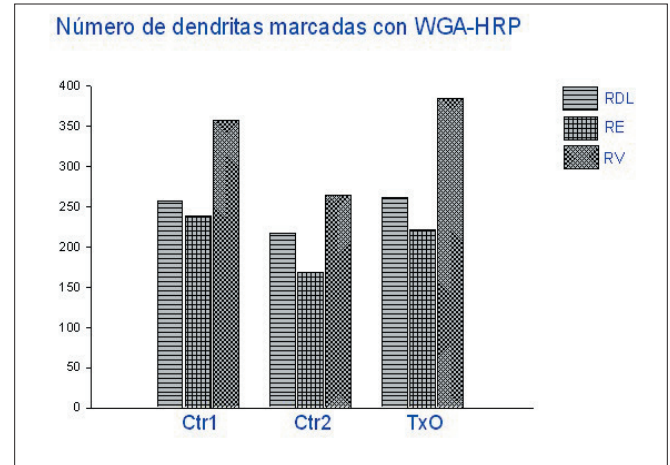


Fig 3. Representación gráfica de los valores obtenidos en el número de dendritas marcadas con WGA-HRP de la región dorsolateral (RDL), región del epéndimo (RE) y región ventral (RV) de las motoneuronas que inervan al músculo Pc. Las barras representan los grupos de machos con implante intratecal (Ctr 1); machos con médula espinal lesionada con implante intratecal-minibomba Alzet y con tratamiento de solución salina (Ctr 2), y de machos espinalizados con tratamiento de oxitocina (TxO).

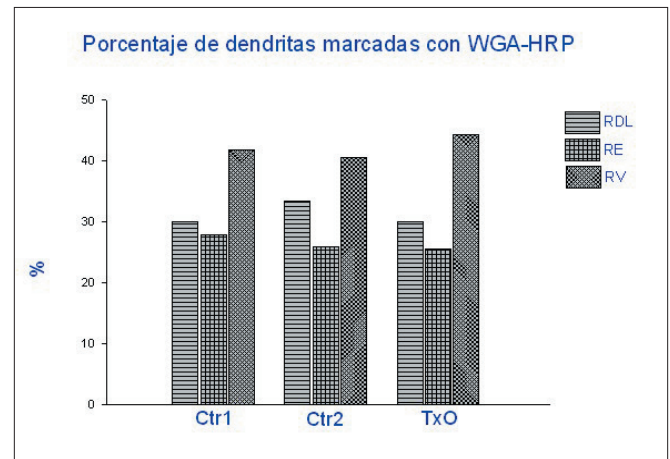


Fig 4. Representación gráfica de los valores obtenidos en el porcentaje de dendritas marcadas con WGA-HRP de la región dorsolateral (RDL), región del epéndimo (RE) y región ventral (RV) de las motoneuronas que inervan al músculo Pc. Las barras representan el porcentaje de los grupos de machos con implante intratecal (Ctr 1); machos con médula espinal lesionada con implante intratecal-minibomba Alzet y con tratamiento de solución salina (Ctr 2), y de machos espinalizados con tratamiento de oxitocina (TxO).

DISCUSIÓN

Efectos de la Oxitocina (OT) sobre las dendritas de las motoneuronas del Pubococcígeo.

La sección completa transversal (o espinalización como también se le conoce) produjo una reducción en el sistema de transporte intracelular de sustancias de las dendritas de motoneuronas del Pc, el cual es un reflejo en la tinción de

neuronas con dendritas pequeñas, sugerimos al igual que otros autores, que esto se debe porque la velocidad de transporte está reducida, o bien, está reducida la cantidad de material transportado ⁽⁹⁾.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que la OT indujo una restauración en el marcaje retrógrado intracelular con WGA-HRP en las dendritas analizadas de ratas macho espinalizadas. Esto es, el péptido influye en las estructuras principales de comunicación de las motoneuronas. Así, los datos obtenidos demostraron un patrón de distribución de las dendritas de las motoneuronas dentro de la sustancia gris de la médula espinal, que consistió en una “sensibilidad morfológica diferencial” de las dendritas primarias. La OT restaura los valores similares a los intactos en la longitud de las dendritas en las regiones del epéndimo y la región ventral en ratas espinalizadas. Sin embargo, el péptido incluso aumentó de tal forma que los datos fueron estadísticamente significativos en la longitud de dendritas dirigidas hacia la región dorsolateral hasta llegar a valores similares a los intactos, esta región gris de la médula espinal es donde se encuentran localizadas neuronas autonómicas, como las que conforman el núcleo parasimpático sacro. De esta forma, estas dendritas con dirección dorsolateral son más sensibles a la OT.

Como hipotetizábamos que estas dendritas dirigidas principalmente hacia la región dorsolateral podría deberse a que serían en mayor número, decidimos analizar el número de dendritas teñidas que proyectaban hacia las tres regiones espinales. Los datos mostraron que el número de dendritas fue siempre mayor hacia la región ventral independientemente del grupo de tratamiento, mientras que en las otras dos regiones los valores fueron similares. Así mismo, los valores demostraron que el grupo de animales espinalizados y tratados con solución salina (Ctr 2) presentaron un menor número de dendritas dirigidas hacia las tres regiones en comparación con el número de dendritas de los otros dos grupos. De tal forma que, en animales espinalizados con tratamiento de OT (TxO), el número de dendritas dirigidas hacia las tres regiones fueron similares al número de dendritas del grupo de animales intactos de la médula espinal (Ctr1). Por otro lado, en relación al porcentaje de dendritas marcadas con WGA-HRP, se observó que el porcentaje de dendritas marcadas independientemente

del grupo de tratamiento, en la región ventral siempre fue superior (aproximadamente el 40%) en comparación con las otras dos regiones (cada una con aproximadamente el 30%). Estos últimos datos demostraron que las dendritas encontradas en dirección a la región ventral siempre fueron el mayor número que las dendritas dirigidas hacia las otras dos regiones. Se debe considerar que la significancia funcional de estas proyecciones ventrales podría estar asociada con el fascículo propioespinal, que se encuentra en el borde de la sustancia gris de la médula espinal y el cual lleva comunicación intersegmentaria espinal a otras motoneuronas localizadas tanto a un nivel rostral como caudal de la médula espinal.

Estos resultados obtenidos permiten proponer que la OT promueve una distribución de la enzima transportada en las dendritas con dirección dorsolateral, sin embargo, no sabemos si éstas tienen receptores de OT. Por ello, proponemos que el efecto en las motoneuronas del Pc se explicaría por dos hipótesis: 1) podría ser un efecto indirecto a través de un sistema de interneuronas, ya que no se ha demostrado la presencia de receptores de OT en las motoneuronas del Pc. Existen estudios donde se han observado contactos de sinapsis entre fibras inmunorreactivas a OT y neuronas espinales en diversas áreas del asta dorsal de la médula espinal de la rata ^(18;19); 2) podría ser un efecto directo sobre las dendritas de las motoneuronas si es que en ellas son más largas y tienen receptores a OT, ya que éstas dendritas se dirigen particularmente hacia las regiones del epéndimo y región autonómica, donde se halla el núcleo parasimpático sacro. En estas dos áreas espinales se ha observado que existe inmunorreactividad a OT.

Además, existen estudios donde han mostrado la existencia de otros núcleos cerebrales con proyecciones hacia las motoneuronas lumbosacras y con una variedad de neurotransmisores que podrían también ejercer esta influencia en el transporte intracelular de sustancias en las dendritas de motoneuronas lumbares. Estos estudios han demostrado que la región lumbosacra contiene neuronas inmunorreactivas a una variedad de sustancias como péptido vasointestinal (VIP, por sus siglas en inglés), sustancia P, somatostatina, encefalina, noradrenalina, hormona liberadora de tirotrópina, serotonina y OT ⁽²⁰⁾. Así mismo, existen estudios más específicos que muestran

la existencia de innervación serotoninérgica en médula espinal de la rata, estas fibras se localizaron en la columna intermediolateral, en donde se encuentran las neuronas del núcleo parasimpático sacro, y que la hormona liberadora de tirotropina fue colocalizada en algunas de estas fibras ⁽²¹⁾. Del mismo modo, se han determinado los circuitos neuronales entre el cerebro y las motoneuronas espinales del músculo bulboespongioso, y que involucran al núcleo de Barrington, núcleo reticularis magnocelularis, y núcleo paragigantocelularis. El marcaje también se extendió a otras poblaciones de neuronas asociadas con el control de la actividad sexual y de micción (área gris periacueductal, núcleo paraventricular, área preóptica media, y corteza prefrontal) así como vías motoras descendentes somáticas (como las neuronas del fascículo vestibuloespinal, reticuloespinal, regiones de corteza sensorimotoras y del núcleo rojo). Por ello, algunos autores han propuesto que el flujo de información autonómico y somático hacia los órganos pélvicos estaría controlado por distintas poblaciones de interneuronas ⁽²²⁾. Por lo tanto, se debe considerar que una variedad de neurotransmisores liberados por las vías descendentes de distintos núcleos cerebrales podrían estar involucrados en la regulación del sistema de transportación intracelular de sustancias de motoneuronas espinales lumbosacras, como las del Pubococcígeo.

Significancia funcional de los resultados obtenidos.

Los resultados mostraron la fuerte influencia de la OT en las dendritas de motoneuronas distales (área lumbar-sacra) respecto al sitio de lesión espinal (área torácica). Se ha reportado que neuronas distales al sitio de lesión reducen la capacidad de producir una respuesta apropiadamente ante cualquier tipo de estimulación. Esto es un asunto de interés relevante para la investigación con respecto a la regeneración espinal en sujetos lesionados. Varios estudios han tratado de inducir la regeneración espinal y han obtenido una parte de la restauración motora, pero no una recuperación funcional completa ^(23,24). Cualquiera que sea el papel de la oxitocina (excitación o inhibición), en la presente investigación se observó que aumenta el transporte intracelular de sustancias (como el HRP) en el soma y dendritas de las motoneuronas, por lo que este péptido podría ser un componente adicional significativo para emplear

paradigmas enfocados a obtener un ambiente permisivo en la médula espinal lesionada. Además, la OT podría actuar junto con la administración de factores neurotróficos de crecimiento (NGF), trasplantes de distintos tipos de células (glía envolvente del bulbo olfatorio, células madre, además de neuroprotectores como la progesterona) que hoy en día se están utilizando para regenerar la médula espinal dañada. Sin embargo, aún faltan más estudios por realizarse para entender los mecanismos fisiológicos de restauración estructural y funcional en neuronas de sujetos con lesión espinal, y de esta forma, poder encontrar las estrategias adecuadas para restaurar la función dañada en esta estructura importante dentro del sistema nervioso central.

CONCLUSIONES

La lesión de la médula espinal reduce la longitud de las dendritas hacia las regiones del canal central (o del epéndimo), dorsolateral y ventral de la sustancia gris de la médula espinal lumbosacra. La OT restaura el daño producido por la lesión espinal. La región de mayor marcaje con WGA-HRP reflejada en la longitud de las dendritas primarias es la región dorsolateral, lo que podría sugerir que las dendritas de las motoneuronas que innervan al músculo Pc dirigidas hacia la región autonómica son más sensibles a oxitocina que las dendritas dirigidas hacia la región del epéndimo y la región ventral.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al CONACYT el apoyo financiero otorgado [Beca Reg. No. 153785 (CAP); Proyecto 33124-N (JM)], para la realización de este reporte de investigación.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Manzo J, y col. (1997). The role of pubococcygeus muscle in urinary continence in the male rat. *J Urol.* 157:2402-6.
- 2 Manzo J, y col. (1999). Regulation of noncontact erection in rats by gonadal steroids. *Horm Behav.* 35:264-70.
- 3 Manzo J, y col. (2000). Fertility ratio in male rats: effects after denervation of two pelvic floor muscles. *Physiol Behav.* 68:611-18.

- 4 Manzo J, y col. (2002). Neuroendocrine control of urine-marking behavior in male rats. *Physiol Behav.* 2002;75:25-32.
- 5 Mesulam MM. (1978). Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem.* 26:106-17.
- 6 Manzo J, y col. (1999). Spinal organization and steroid sensitivity of motoneurons innervating the pubococcygeus muscle in the male rat. *J Comp Neurol.* 409:358-68.
- 7 Arnold AP, Gorski RA. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 7:413-42.
- 8 Kurz EM, Sengelaub DR, Arnold AP. (1986). Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science.* 232:395-98.
- 9 Sasaki M, Arnold AP. (1991). Androgenic regulation of dendritic trees of motoneurons in the spinal nucleus of the bulbocavernosus: reconstruction after intracellular iontophoresis of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 308:11-27.
- 10 MacLusky NJ, col. (1987). Metabolism and binding of androgens in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 422:83-91.
- 11 Sawchenko PE, Swanson LW. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 205:260-272.
- 12 Shen P, Arnold AP, Micevych PE. (1990). Supraspinal projections to the ventromedial lumbar spinal cord in adult male rats. *J Comp Neurol.* 300:263-72.
- 13 Wagner CK, (1991). Clemens LG. Projections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus to the sexually dimorphic lumbosacral region of the spinal cord. *Brain Res.* 539:254-62.
- 14 Wagner CK, Sisk CL, Clemens LG. (1993). Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the sexually dimorphic lower lumbar spinal cord concentrate 3H-estradiol in the male rat. *J Neuroendocrinol.* 5:545-51.
- 15 Ackerman AE, Lange GM, Clemens LG. (1997). Effects of paraventricular lesions on sex behavior and seminal emission in male rats. *Physiol Behav.* 63:49-53.
- 16 Hawthorn J, Ang VT, Jenkins JS. (1985). Effects of lesions in the hypothalamic paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nuclei on vasopressin and oxytocin in rat brain and spinal cord. *Brain Res.* 346:51-57.
- 17 Perez CA, y col. (1998). Influence of the paraventricular nucleus and oxytocin on the retrograde stain of pubococcygeus muscle motoneurons in male rats. *Brain Res.* 2005;1041:11-18.
- 18 Tang Y, Rampin O, Calas A, Facchinetti P, Giuliano F. Oxytocinergic and serotonergic innervation of identified lumbosacral nuclei controlling penile erection in the male rat. *Neuroscience.* 82:241-54.
- 19 Swanson LW, McKellar S. (1979). The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J Comp Neurol.* 188:87-106.
- 20 Honda CN, Lee CL. (1985). Immunohistochemistry of synaptic input and functional characterizations of neurons near the spinal central canal. *Brain Res.* 343:120-128.
- 21 Helke CJ, y col. (1986). Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column: partial coexistence with serotonin. *Brain Res.* 381:1-7.
- 22 Tang Y, y col. (1999). Spinal and brain circuits to motoneurons of the bulbospongiosus muscle: retrograde transneuronal tracing with rabies virus. *J Comp Neurol.* 414:167-92.
- 23 Aguayo AJ, y col. (1991). Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 331:337-43.
- 24 Ramon-Cueto A, y col. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in

their spinal cords by olfactory ensheathing glia.
Neuron. 25:425-35.

Responsable:

Dr. Cesar A. Pérez

Instituto de Neurootología, Universidad Veracruzana.

Apartado Postal 566. Xalapa, Ver. CP. 91190. México

Tel/Fax: (228) 841-8900 Ext. 13609

E-mail: cesperez@uv.mx