



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA CONEXIÓN ANATOMO-FUNCIONAL OXITOCINÉRGICA
ENTRE EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO Y LA
CORTEZA INSULAR AGRANULAR ROSTRAL Y SU FUNCIÓN EN LA
NOCICEPCIÓN EN LA RATA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MOHAMMED GAMAL MOHAMMED ELSEBAEY ELTRABILY

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ABIMAEEL GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DR. GERARDO ROJAS PILONI
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. FRANCISCO PELLICER GRAHAM
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, OCTUBRE DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio B-16 del Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología en la UNAM Campus Juriquilla bajo la dirección del **Dr. Abimael González Hernández**.

La realización de esta tesis doctoral fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado con número 808245, así como a través de proyectos de investigación básica financiados por el CONACyT (A1-S-23631) y por el PAPIIT-UNAM (IA203119).

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos	7
Abreviaturas	8
Índice de figuras	9
Resumen	10
Abstract	11
1. MARCO TEÓRICO	12
1.1. Generalidades en el estudio del dolor	12
1.2. La nocicepción y los mecanismos biológicos de su modulación	13
1.3. La corteza insular: su estructura y función en el dolor	14
1.4. La corteza insular agranular rostral (RAIC) en la nocicepción	15
1.4.1. Las conexiones neuronales de la RAIC relacionadas con la nocicepción	15
1.4.2. El papel de la RAIC en la modulación de la nocicepción: la participación de varios neurotransmisores	16
1.5. El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN): sus conexiones y su papel en la modulación de la nocicepción	19
1.5.1. Generalidades	19
1.5.2. El papel de la oxitocina (OT) como un modulador de la nocicepción	21
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23

4.	HIPÓTESIS	23
5.	OBJETIVOS	23
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1.	Animales	24
6.2.	Experimentos de trazado neuronal e inmunofluorescencia	24
6.2.1.	Inyecciones de trazador retrógrado (<i>Fluoro-Gold</i> ®) en la RAIC	24
6.2.2.	Pruebas de inmunofluorescencia en el PVN contra oxitocina (OT) y <i>Fluoro-Gold</i> ®	25
6.2.3.	Inyección de trazador anterógrado (<i>Fluoro-Ruby</i> ®) en el PVN	26
6.2.4.	Pruebas de inmunofluorescencia en la RAIC contra GABA y el receptor a oxitocina (OTR)	27
6.3.	Microinyecciones de oxitocina (OT) en la RAIC y evaluación de la nocicepción	27
6.3.1.	Experimentos conductuales parte 1: prueba de la formalina	27
6.3.1.1.	<i>Diseño experimental</i>	27
6.3.1.2.	<i>Análisis estadístico de resultados</i>	30
6.3.2.	Experimentos conductuales parte 2: prueba de coordinación motora	30
6.3.2.1.	<i>Diseño experimental</i>	30
6.3.2.2.	<i>Análisis estadístico de resultados</i>	31
6.3.3.	Experimentos electrofisiológicos	32
6.3.3.1.	<i>Registro extracelular unitario de neuronas de amplio rango dinámico (WDR)</i>	32

6.3.3.2.	<i>Diseño experimental</i>	32
6.3.3.3.	<i>Análisis estadístico de resultados</i>	34
7.	RESULTADOS	35
7.1.	Trazado de la vía neuronal entre la RAIC y el PVN	35
7.1.1.	La microinyección de <i>Fluoro-Gold</i> ® en la RAIC marca bilateralmente células del PVN	35
7.1.2.	La microinyección de <i>Fluoro-Ruby</i> ® en el PVN marca bilateralmente fibras en la RAIC	35
7.2.	Las inervaciones oxitocinérgicas del PVN hacia la RAIC	37
7.2.1.	Las células del PVN que proyectan a la RAIC son marcadas con inmunofluorescencia a oxitocina (OT)	37
7.3.	Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la nocicepción	38
7.3.1.	Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la nocicepción inducida por la formalina	38
7.3.2.	Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la coordinación motora	38
7.3.3.	Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la actividad neuronal “espontánea” de las neuronas WDR espinales	40
7.4.	Participación de los receptores OTR, GABA_A o α_{2A}-adrenérgicos en la antinocicepción inducida por la oxitocina (OT)	43
7.4.1.	Efecto del bloqueo de los receptores a oxitocina (OTR), GABA _A o α _{2A} -adrenérgicos en la antinocicepción inducida por oxitocina (OT)	43

7.4.2.	Efecto <i>per se</i> de los antagonistas a los receptores a oxitocina (OTR), GABA _A o α_{2A} -adrenérgicos sobre la nocicepción inducida por formalina	43
7.4.3.	Las células de proyecciones del PVN destinan neuronas GABAérgicas y células que expresan OTR en la RAIC	44
8.	DISCUSIÓN	47
8.1.	Las proyecciones oxitocinérgicas del PVN hacia la RAIC y la posible participación de otros péptidos	47
8.2.	El efecto antinociceptivo de la oxitocina (OT) en la RAIC: evidencia sobre el efecto modulador de OT a nivel cortical en la nocicepción	49
8.3.	La oxitocina (OT) promueve la actividad GABAérgica en la RAIC y un efecto noradrenérgico descendente: evidencias y otros posibles mecanismos	52
8.4.	Perspectivas del Proyecto	55
9.	CONCLUSIONES	56
	Referencias	57
	Apéndice	70
a.	Publicaciones	70
b.	Resúmenes en congresos	71
c.	Reconocimientos	72

Agradecimientos

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por proveer los cursos necesarios para mi formación académica.

Quiero agradecer a mi tutor principal, el Dr. Abimael González Hernández, a los miembros de mi comité tutor, el Dr. Gerardo Rojas Piloni y el Dr. Francisco Pellicer Graham, así como al Dr. Miguel Condes Lara por sus indicaciones, recomendaciones y retroalimentación a lo largo del proceso de realizar la presente tesis doctoral, cuidando todos los aspectos técnicos e intelectuales requeridos para concluir este proyecto.

A la Dra. María Guadalupe Martínez Lorenzana por la asistencia técnica en el montaje de las técnicas de trazado neuronal, inmunofluorescencia y microscopia confocal. Al Dr. Alfredo Manzano García por ser un gran mentor en el proceso de realización de este proyecto.

A mi familia en México, mi esposa Dulce y mi hijo Karim, por su gran apoyo y comprensión.

A mi familia en Egipto, quienes, a pesar de la distancia, estuvieron ahí para animarme y mostraron su interés y apoyo.

إلى عائلتي الصغيرة والكبيرة في مصر, إلى الأصدقاء, الي كل من شجعني (علي قلتهم), الي أبي و أخي و أختي..و بالأخص الي أمي الحبيبة-رحمة الله عليها- التي طالما كانت تحلم بهذا اليوم...شكرا لكم جميعا علي دعمكم رغم البعد الجغرافي و لكن كنتم دائما متواجدين من أجلي...شكرا لكم جميعا

A mis compañeros de laboratorio, Enrique, Gustavo, Irma, María y Toño por sus sugerencias, discusiones y compañerismo.

Abreviaturas

ACC: corteza cingular anterior

AMG: amígdala

GABA: ácido γ -aminobutírico

LC: locus cerúleos

OT: oxitocina

OTR: receptor a oxitocina

PAG: sustancia gris periacueductal

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo

RAIC: corteza insular agranular rostral

RM: Rafe Magnus

RVM: médula ventromedial

VPL: núcleo ventroposterolateral del tálamo

VTA: área tegmental ventral

WDR: amplio rango dinámico

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. El papel de la RAIC en la modulación de nocicepción	18
Figura 2. Proyecciones neuronales del PVN hacia la RAIC	36
Figura 3. La participación de OT en la innervación del PVN a la RAIC	37
Figura 4. La microinyección de OT en la RAIC produce antinocicepción sin alteraciones en la coordinación motora	39
Figura 5. Registro electrofisiológico de neuronas espinales de amplio rango dinámico (WDR) y su respuesta ante la administración periférica de formalina ...	41
Figura 6. La microinyección de OT en la RAIC disminuye la actividad de neuronas WDR espinales inducida por la formalina	42
Figura 7. Posible mecanismo del efecto antinociceptivo inducido por OT en la RAIC	45
Figura 8. Las proyecciones del PVN destinan neuronas GABAérgicas y células que expresan el receptor a oxitocina (OTR) en la RAIC	46
Figura 9. Un resumen esquemático de los principales hallazgos obtenidos en este estudio	48

Resumen

La corteza insular agranular rostral (RAIC) es una estructura relevante en la nocicepción. El reclutamiento de la actividad GABAérgica en la RAIC promueve la desinhibición del locus cerúleos (LC), que a su vez inhibe (por acción noradrenérgica) la entrada nociceptiva periférica a nivel de la médula espinal. En este sentido, a nivel cortical, la oxitocina (OT) puede modular la transmisión GABAérgica; en consecuencia, podría existir una interacción que modula la nocicepción entre la OT y el GABA en la RAIC. En el presente proyecto, probamos en ratas Wistar macho el efecto de la microinyección de OT en la RAIC durante la presencia de un estímulo nocivo inflamatorio (por inyección periférica subcutánea de formalina). La microinyección de OT produce una disminución de (1) las sacudidas de pata inducidos por la formalina; y (2) el disparo espontáneo de neuronas espinales de amplio rango dinámico. Este efecto antinociceptivo fue abolido por la microinyección (en la RAIC) de: (1) L-368,899 (un antagonista del receptor a oxitocina [OTR]) o por (2) bicuculina (un bloqueador del canal GABA_A), lo que sugiere una activación GABAérgica inducida por OTR. Dado que la inyección intratecal de un antagonista de los receptores α_{2A} -adrenérgicos (BRL 44408) revirtió parcialmente el efecto de la OT, se sugiere la presencia de antinocicepción noradrenérgica descendente. Además, la inyección de L-368,899 *per se* induce un efecto conductual pronociceptivo, lo que sugiere una liberación tónica de OT endógena durante la estimulación nociceptiva inflamatoria. Adicionalmente, encontramos proyecciones bilaterales desde el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) hacia la RAIC. Algunas de las células de proyección del PVN son oxitocinérgicas y destinan neuronas GABAérgicas y células que expresan OTR dentro de la RAIC. Aparte del vínculo anatómico directo entre el PVN y la RAIC, nuestros hallazgos proporcionan evidencia sobre el papel de los mecanismos oxitocinérgicos que modulan el proceso de nocicepción a nivel de la RAIC.

Abstract

The rostral agranular insular cortex (RAIC) is a relevant structure in nociception. Indeed, recruitment of GABAergic activity in RAIC promotes the disinhibition of the locus ceruleus, which in turn inhibits (by noradrenergic action) the peripheral nociceptive input at the spinal cord level. In this regard, at the cortical level, oxytocin can modulate the GABAergic transmission; consequently, an interaction modulating nociception could exist between oxytocin and GABA at RAIC. Here, we tested in male Wistar rats the effect of oxytocin microinjection into RAIC during an inflammatory (by subcutaneous peripheral injection of formalin) nociceptive input. Oxytocin microinjection produces a diminution of (1) flinches induced by formalin and (2) spontaneous firing of spinal wide dynamic range cells. The above antinociceptive effect was abolished by microinjection (at RAIC) of the following: (1) L-368,899 (an oxytocin receptor [OTR] antagonist) or by (2) bicuculline (a GABA_A channel blocker), suggesting a GABAergic activation induced by OTR. Since intrathecal injection of an α_{2A} -adrenoceptor antagonist (BRL 44408) partially reversed the oxytocin effect, a descending noradrenergic antinociception is suggested. Further, injection of L-368,899 per se induces a pronociceptive behavioral effect, suggesting a tonic endogenous oxytocin release during inflammatory nociceptive input. Accordingly, we found bilateral projections from the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) to RAIC. Some of the PVN-projecting cells are oxytocinergic and destinate GABAergic and OTR expressing cells inside RAIC. Aside from the direct anatomic link between PVN and RAIC, our findings provide evidence about the role of oxytocinergic mechanisms modulating the pain process at the RAIC level.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades en el estudio del dolor

De acuerdo a la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), el dolor es una experiencia física y emocional desagradable asociada, o parece estar asociada con un daño real o potencial en el tejido. Con el fin de proveer nuevas herramientas para el manejo del dolor (principal motivo de consulta médica), el estudio de la neurobiología de este fenómeno es importante para entender los mecanismos involucrados en su procesamiento (Goldberg y McGee, 2011; Nahin, 2015). De forma breve, el dolor se puede clasificar con base a su duración (agudo, subagudo y crónico), su origen (periférico y central), su etiología/mecanismo (nociceptivo, neuropático y psicogénico) y su caracterización (ardor, pesadez, *etc*) (Hall y Guyton, 2008).

En este contexto, el procesamiento neuronal ante un estímulo nociceptivo que produce dolor incluye la codificación de dos aspectos: (i) aspectos físicos (*i.e.* tipo, intensidad, localización y duración); y (ii) aspectos afectivos relacionados con la respuesta emocional desagradable que forma parte de la experiencia del dolor (Hall y Guyton, 2008).

En este contexto, los modelos animales de dolor han sido importantes para entender los procesos fisiológicos involucrados en el fenómeno del dolor (Gregory *et al.*, 2013). Aunque los animales no tienen la capacidad de notificar el dolor, su conducta ante la presencia de un estímulo nociceptivo puede ser cuantificada de manera subjetiva. Por lo tanto, algunos reflejos simples (sacudidas) o conductas innatas (lamer la pata inflamada) que se inducen por un estímulo nocivo pueden ser observados y analizados para evaluar el efecto de ciertos procedimientos experimentales sobre el procesamiento de la nocicepción (Gregory *et al.*, 2013; Mogil, 2009).

1.2. La nocicepción y los mecanismos biológicos de su modulación

La nocicepción es el proceso neuronal de codificación de estímulos nocivos (Loeser y Treede, 2008). Este proceso inicia con la detección del estímulo nocivo, de diferentes modalidades *i.e.* mecánica, química, térmica o eléctrica, por medio de los nociceptores presentes a nivel periférico. Posteriormente, los impulsos nerviosos viajan por medio de las aferentes primarias nociceptivas que incluyen principalmente dos tipos de fibras con diferente velocidad de conducción: (i) las fibras A δ , ligeramente mielinizadas (en comparación con las fibras A α y A β); y (ii) las fibras C no mielinizadas. Estas fibras nerviosas de primer orden llegan a nivel de la medula espinal donde tiene su conexión sináptica con neuronas de proyección (neuronas de segundo orden). De forma clásica se ha descrito que los axones de dichas neuronas ascienden, como parte del sistema anterolateral, hasta el núcleo ventroposterolateral del tálamo (VPL) donde se encuentra la tercera sinapsis. De ahí, las proyecciones talámicas destinan diversas áreas corticales que incluyen la corteza somatosensorial primaria, la corteza insular y la corteza cingular anterior (Fox, 2014; Hall y Guyton, 2008).

La modulación de la nocicepción se puede realizar a diferentes niveles; periférico, espinal y supraespinal (Basbaum y Field, 1978). A nivel espinal, existe una circuitería neuronal que regula tanto la entrada como la transmisión de información nociceptiva. En este nivel participan diferentes elementos neuronales que incluyen, las aferentes primarias, las neuronas de proyección, las interneuronas inhibitoras (GABAérgicas) y excitadoras, los astrocitos, así como los axones descendentes de estructuras supraespinales, entre los que destacan: (i) la sustancia gris periacueductal (PAG); (ii) el locus cerúleos (LC) ; (iii) la médula ventromedial rostral (RVM); y el (iv) núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)

(Condés-Lara *et al.*, 2008; DeLaTorre *et al.*, 2009; Gebhart, 2004; Gilbert y Franklin, 2001; Hall y Guyton, 2008; Heinricher *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 1989; Tsuruoka y Willis, 1996a; Zhang *et al.*, 1997; Zhuo y Gebhart, 1997). A nivel supraespinal, varias estructuras del tallo cerebral (*i.e.* PAG, LC, RVM y PVN) proyectan a las astas dorsales de la médula espinal donde regulan la información nociceptiva (Condés-Lara *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 1989; Tsuruoka y Willis, 1996a; Zhand *et al.*, 1997). Adicionalmente, áreas corticales como la corteza cingular anterior (ACC), la corteza prefrontal, la corteza motora y la corteza insular pueden modular la nocicepción por medio de dos mecanismos: (i) la activación de las áreas del tallo cerebral anteriormente mencionados promoviendo un efecto modulador descendente; o a través (ii) de las interacciones cortico-corticales o cortico-subcorticales (Gamal-Eltrabily *et al.*, 2021; Ohara *et al.*, 2005; Quintero, 2013). Por ejemplo, las vías neuronales entre el ACC y el tálamo medial, así como, la conexión entre la corteza insular y la amígdala (AMG) han sido descritas como elementos importantes para modular la información nociceptiva (Jasmin *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006; You *et al.*, 2013).

En ese marco, este proyecto fue diseñado para estudiar la relación entre dos estructuras supraespinales involucradas en la modulación de la nocicepción, la corteza insular y el PVN.

1.3. La corteza insular: su estructura y función en el dolor

La corteza insular está relacionada con diversos procesos biológicos como la memoria, procesos somatosensoriales y auditivos, adicción y dolor (Nieuwenhuys, 2012). Evidencias clínicas demuestran que lesiones en la corteza insular afectan el proceso de la percepción del dolor como ha sido descrito en el síndrome de asimbolia del dolor (Berthier *et al.*, 1988) y el síndrome del dolor pseudotalámico (Schmahmann y Leifer, 1992). En ratas, basado en su

citoarquitectura, dicha corteza está dividida en tres regiones, agranular anterior, disgranular y granular posterior (Jasmin *et al.*, 2004; Nieuwenhuys, 2012; Paxinos y Watson, 2007). En la nocicepción, se ha postulado que la corteza insular es un sitio importante de integración entre los elementos sensoriales y emocionales de los estímulos nocivos (Lu *et al.*, 2016). En este contexto, la corteza insular posterior está principalmente asociada con el procesamiento de los aspectos somatosensoriales, mientras que la corteza insular anterior está relacionada con los elementos afectivos del estímulo nocivo (Lu *et al.*, 2016; Nieuwenhuys, 2012). En el presente trabajo, se analizó la posible modulación oxitocinérgica de la región rostral de la corteza insular que está relacionada con el procesamiento de aspectos afectivos de la nocicepción. Ciertamente, la OT puede modular la respuesta neuronal ante emociones negativas como el miedo y la ansiedad (Peters *et al.*, 2014; van den Burg y Hegoburu, 2020). De ahí, la OT puede regular la codificación de elementos afectivos de estímulos nocivos a nivel de dicha corteza.

1.4. La corteza insular agranular rostral (RAIC) en la nocicepción

1.4.1. Las conexiones neuronales de la RAIC relacionadas con la nocicepción

En este sentido, se ha demostrado que la corteza insular agranular rostral (RAIC) está involucrada en los procesos nociceptivos. Esta tiene conexiones directas con varias áreas del cerebro las cuales se relacionan con el procesamiento de la nocicepción, por ejemplo, con los núcleos talámicos mediales, la AMG y la ACC (Jasmin *et al.*, 2004). Por otra parte, la RAIC recibe aferentes de subnúcleos talámicos ipsilaterales, así como sus conexiones mesolímbicas, lo cual señala su importancia en procesar información relacionada con aspectos afectivos del estímulo nocivo. (Lu *et al.*, 2016). Adicionalmente, las eferentes de la

RAIC destinan áreas cerebrales importantes en la modulación de la nocicepción (*e.g.*, la AMG, el PAG, el núcleo parabraquial y el RM). Dichas áreas, entre otras, representan elementos importantes del sistema endógeno de la modulación de la nocicepción (Heinricher y Ingram, 2009). En este contexto, aun cuando no se ha descrito una conexión directa entre la RAIC y el LC, se considera que la corteza insular puede modular la actividad neuronal en LC por medio de sus inervaciones hacia neuronas GABAérgicas en las áreas peri-LC (Jasmin *et al.*, 2003, 2004).

1.4.2. El papel de la RAIC en la modulación de la nocicepción: la participación de varios neurotransmisores

En este contexto, la lesión de la RAIC aumenta los umbrales de retirada en modelos de dolor crónico e inflamatorio, sin embargo, este efecto no está presente en modelos de dolor agudo (Coffeen *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que la RAIC puede tener una función pronociceptiva mediada por la conexión bidireccional entre la RAIC y la AMG, que es una estructura conocida por su papel en el dolor y el miedo (Jasmin *et al.*, 2003).

Burkey *et al.* (1996) demostraron que la microinyección unilateral de morfina en la RAIC disminuye la nocicepción inducida por formalina, este efecto puede ser bloqueado por la administración sistémica de naltrexona. Estos datos en su conjunto sugieren la existencia de receptores μ -opioides en la RAIC. Dicho efecto antinociceptivo parece ser mediado en parte por un mecanismo inhibitorio descendente considerando que la expresión de *c-fos* disminuyó a nivel de las astas dorsales de la médula en los animales a los cuales se les microinyectó morfina en la RAIC.

Por otra parte, incrementar la concentración de dopamina en la RAIC produce un efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina (Burkey *et al.*, 1999). Este efecto

antinociceptivo es mediado por la modulación de la actividad de receptores dopaminérgicos en la RAIC. De hecho, el antagonismo del receptor D_1 y el agonismo al receptor D_2 fue descrito como el mecanismo posible de dicho efecto antinociceptivo (Coffeen *et al.*, 2008). Otro estudio demostró que las inervaciones dopaminérgicas que provienen del área tegmental ventral (VTA) hacia la RAIC se dirigen a neuronas GABAérgicas lo cual señala a la actividad GABAérgica local como otro posible mecanismo del efecto antinociceptivo inducido por la dopamina en la RAIC (Ohara *et al.*, 2003).

En este sentido, Jasmin *et al.*, (2003) demostraron que los cambios locales en los niveles de GABA en la RAIC producen diversos efectos sobre la respuesta nociceptiva. Mientras que el aumento de los niveles locales de GABA en la RAIC produce analgesia, el bloqueo selectivo de los receptores $GABA_B$ en la RAIC genera hiperalgesia. En este contexto, los autores sugieren que el efecto de la RAIC sobre la modulación del dolor es mediado por dos diferentes mecanismos (Figura 1).

El primer mecanismo se lleva a cabo por la activación de los receptores $GABA_B$ los cuales ejercen una inhibición tónica sobre la AMG y por ende el bloqueo de dichos receptores produce hiperalgesia. El segundo mecanismo es mediado por los receptores $GABA_A$ presentes sobre neuronas glutamatérgicas en la RAIC. La inervación glutamatérgica de la RAIC hacia neuronas GABAérgicas en la PAG, núcleo parabraquial y el RM inhiben la actividad del LC y reprimen su efecto noradrenérgico antinociceptivo a nivel espinal. La activación de los receptores $GABA_A$ en la RAIC rompe con esta inhibición constante del LC produciendo analgesia. Por lo mencionado anteriormente, se puede proponer el papel de la RAIC tanto en el procesamiento de la información nociva como la modulación de esta.

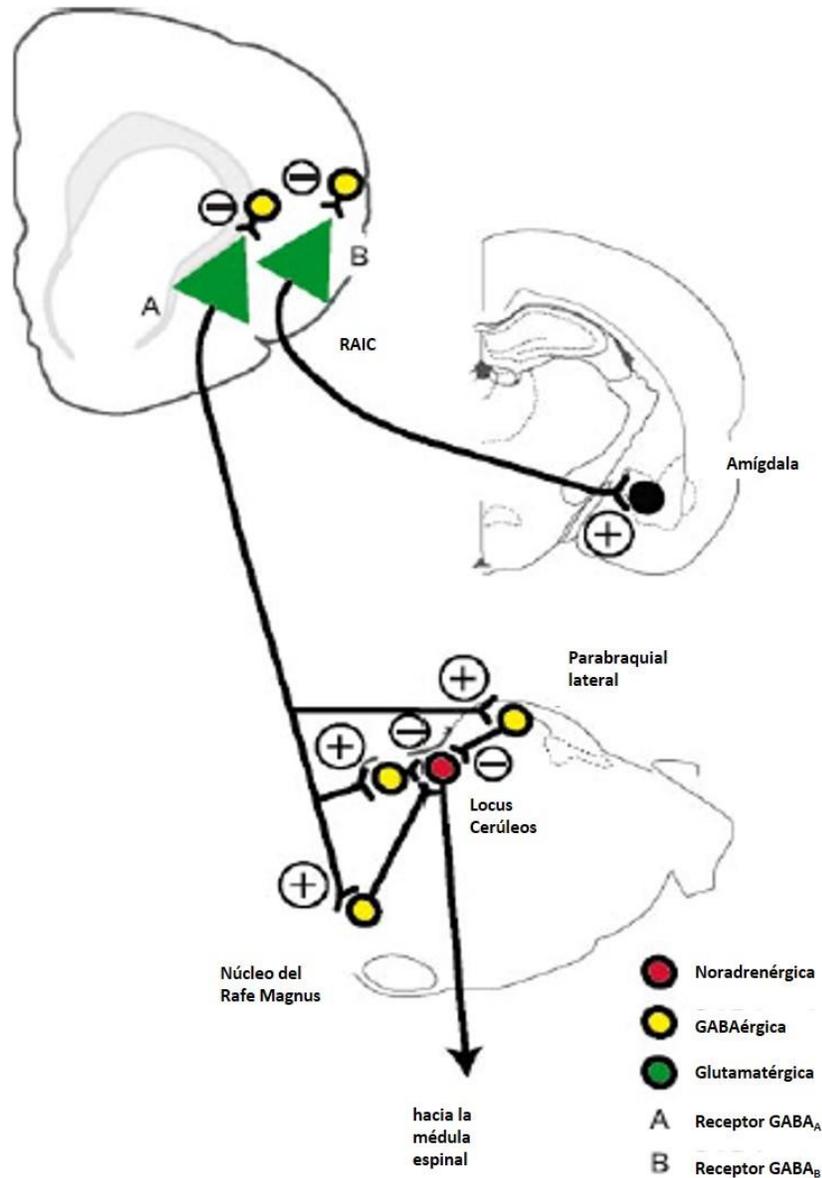


Figura 1. El papel de la RAIC en la modulación de nocicepción. Las proyecciones glutamatérgicas de la RAIC destinan al RM y el núcleo parabraquial, así como, neuronas GABAérgicas en la zona peri-cerulear, de tal manera que ejerce una inhibición tónica sobre LC. De ahí, el aumento de los niveles de GABA en la RAIC activa los receptores GABA_A produciendo una inhibición de estas proyecciones y causando una desinhibición del LC y promoviendo antinocicepción. Por otro lado, el aumento intracortical de GABA inhibe las proyecciones de la RAIC hacia la AMG (relacionado con efectos pronociceptivos) por medio de la activación de los receptores GABA_B, por lo tanto, el bloqueo de GABA_B en la RAIC promueve hiperalgesia. (modificado de Jasmin et al. 2003).

1.5. El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN): sus conexiones y su papel en la modulación de la nocicepción

1.5.1. Generalidades

En este contexto, el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) ha surgido como un elemento importante en el sistema endógeno de la modulación de la nocicepción (Condés-Lara *et al.*, 2007, 2009; Rojas-Piloni *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). La estimulación eléctrica del PVN produce un efecto antinociceptivo a nivel de la médula espinal (Condés-Lara *et al.*, 2009, Yirmiya *et al.*, 1990). Dicho efecto es mediado a través de una conexión oxitocinérgica directa del PVN hacia las astas dorsales de la médula espinal a nivel lumbar y cervical (Condés-Lara *et al.*, 2007, 2009). Adicionalmente, se demostró que el efecto antinociceptivo parece estar mediado en parte a través de la activación de interneuronas GABAérgicas a nivel espinal, sin excluir la participación del sistema opioidérgico endógeno (Rojas-Piloni *et al.*, 2007). También, el PVN establece una red de conexiones con otros núcleos “antinociceptivos” como el RM, LC y PAG (Pittman *et al.*, 1981). La estimulación de PVN-RM y PVN-LC simultáneamente produce un efecto analgésico sinérgico (Condés-Lara *et al.*, 2012; Rojas-Piloni *et al.*, 2012).

En este sentido, el PVN es uno de los principales núcleos que producen OT en el sistema nervioso y estructuralmente este núcleo puede dividirse en dos regiones de acuerdo al tamaño de las neuronas presentes, esto es: (i) región magnocelular que ocupa la porción lateral del PVN, y (ii) región parvocelular que ocupa la parte medial. Sin embargo, las células parvocelulares pueden aparecer aleatoriamente a lo largo del PVN, tienen mayor inervación vascular que las magnocelulares y consecuentemente establecen una relación cercana con

los vasos sanguíneos y pueden estar en contacto con la pared del tercer ventrículo, pero sin pasar la línea ependimal (van den Pol, 1982).

Así se ha descrito que existe una población de neuronas parvocelulares oxitocinérgicas en el PVN la cual puede modular la respuesta nociceptiva a nivel espinal por medio de dos mecanismos (Eliava *et al.*, 2016). Primero por medio de proyecciones parvocelulares oxitocinérgicas directas hacia la médula espinal (Condés-Lara *et al.*, 2007; Eliava *et al.*, 2016); este proceso puede involucrar también otros neuromedadores como el GABA (Rojas-Piloni *et al.*, 2007), 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Godínez-Chaparro *et al.*, 2016) y noradrenalina (NE) (Zhuo *et al.*, 2010). El segundo mecanismo es a través de la activación de las neuronas magnocelulares que liberan OT hacia el torrente sanguíneo por medio de la neurohipófisis (Eliava *et al.*, 2016). En este contexto, González-Hernández *et al.*, (2017) describieron que la administración periférica de OT produce antinocicepción, la cual es mediada por la activación de OTR expresados en las terminaciones nerviosas libres en la piel. Por otro lado, no existen estudios que describen la presencia de proyecciones neuronales del PVN que pueden estar modulando la información nociceptiva a nivel cortical. Aun así, algunas proyecciones oxitocinérgicas del PVN destinan la corteza insular posterior donde están involucradas en la respuesta neuronal en condiciones de miedo (Knobloch *et al.*, 2012).

Tomando en consideración los antecedentes mencionados, el PVN puede ser un núcleo central en la modulación del dolor, lo cual podría sugerir una conexión directa con la RAIC de manera tal que se comuniquen estos dos sistemas moduladores. De esta forma, dicha conexión podría revelar más datos sobre los mecanismos endógenos de modulación de la nocicepción.

1.5.2. El papel de la oxitocina (OT) como un modulador de la nocicepción

La OT es un neuropéptido que induce antinocicepción a nivel suraespinal, espinal y periférico (Rash *et al.*, 2014). A nivel supraespinal, la administración intracerebroventricular de OT induce antinocicepción (Lundeberg *et al.*, 1994; Gao y Yu, 2004; Yang *et al.*, 2007). El sitio de acción específico de dicho efecto no ha sido descrito, sin embargo, la expresión de OTR, ha sido descrita en diferentes áreas supraespinales relacionadas con la modulación de la nocicepción i.e. AMG, núcleo accumbens, el hipotálamo y el tallo cerebral (Bale *et al.*, 2001; Boccia *et al.*, 2013; Knobloch *et al.*, 2012; Mack *et al.*, 2002; Moaddab *et al.*, 2015). En este contexto, la administración de OT en la AMG produce antinocicepción a través de la activación de OTR (Han y Yu, 2009) mientras su administración en el PAG, RM y el núcleo accumbens induce un efecto antinociceptivo lo cual parece ser mediado por el sistema opioide (Ge *et al.*, 2002; Gu y Yu, 2007; Wang *et al.*, 2003). A nivel cortical, la modulación oxitocinérgica de la nocicepción no ha sido estudiada excepto por la corteza orbital ventrolateral donde la administración de OT induce antinocicepción en animales con dolor neuropático, este efecto parece ser mediado por la activación del PAG (Taati y Tamaddonfard, 2018). Finalmente, ante la presencia de un estímulo nociceptivo, los niveles de OT en LC, RM y la médula espinal se incrementan (Yang *et al.*, 2007).

A nivel espinal, la administración intratecal de OT induce antinocicepción, mediada por OTR, en modelos de dolor inflamatorio (Yu *et al.*, 2003). Adicionalmente, la administración intratecal recurrente de OT disminuye la alodinia táctil, la hiperalgesia mecánica y térmica en ratas con dolor neuropático (González-Hernández *et al.*, 2019). En estudios electrofisiológicos a nivel de la médula espinal, la administración tópica de OT disminuye la actividad de neuronas de amplio rango dinámico (WDR) mediada por las fibras A δ y C ante la estimulación eléctrica de su campo receptivo (Rojas-Piloni *et al.*, 2010).

Asimismo, la inyección subcutánea de OT fue asociada con antinocicepción, mediada por OTR, tanto en estudios conductuales como electrofisiológicos (González-Hernández *et al.*, 2017, 2019). Interesantemente, la administración epidural o subcutánea de OT en pacientes con dolor crónico y posquirúrgico, produce analgesia (Condés-Lara *et al.*, 2016; Zayas-González *et al.*, 2019). En su conjunto, estos datos sugieren la presencia de una modulación oxitocinérgica endógena que modula el proceso nociceptivo a diferentes niveles.

2. JUSTIFICACIÓN

La modulación oxitocinérgica de la nocicepción ha sido descrita a diferentes niveles en animales, sin embargo, el estudio de esta modulación a nivel cortical ha sido muy limitado. De ahí, surge el interés de estudiar el papel de la OT en la modulación de la nocicepción en la RAIC siendo una corteza involucrada en este proceso. En este contexto, se conoce el papel del PVN en la modulación de la nocicepción a través de sus proyecciones hacia la medula espinal y la liberación de OT al torrente sanguíneo, aun así, no existen datos que describen su efecto a nivel cortical en presencia de un estímulo nocivo lo cual puede apoyar la consideración del PVN como un núcleo principal en la modulación endógena de la nocicepción. Por lo tanto, la exploración experimental de los efectos antinociceptivos de la OT a nivel de la RAIC y su posible mecanismo proveerá conocimientos sobre dicho proceso mejorando el entendimiento de los mecanismos involucrados en la antinocicepción inducida por la OT y potenciando su futuro uso en el manejo del dolor.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Dado los antecedentes antes mencionados, los experimentos que a continuación se describen fueron formulados para contestar las siguientes preguntas:

- a.* ¿Existe una conexión oxitocinérgica anatomo-funcional entre el PVN y la RAIC?
- b.* ¿Cuál es el papel de la OT en la RAIC en la modulación de nocicepción? y
- c.* ¿Cuál es el mecanismo(s) a través del cual la OT ejerce antinocicepción?

4. HIPÓTESIS

La conexión entre el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y la corteza insular agranular rostral (RAIC) es un elemento del sistema endógeno de la modulación de nocicepción donde la OT puede generar un efecto antinociceptivo a nivel de la corteza insular.

5. OBJETIVO

Estudiar la presencia de proyecciones oxitocinérgicas del PVN hacía la RAIC y la participación de la OT en la modulación de nocicepción a nivel de la RAIC, así como los mecanismos involucrados en dicha modulación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Para el desarrollo de este proyecto se realizaron estudios de trazado neuronal, inmunofluorescencia, conductuales y electrofisiológicos en ratas Wistar macho (280-310 g). Antes de los experimentos, los animales fueron habituados en cajas de acrílico con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (luces encendidas a las 7:00 h), en un cuarto con temperatura ($22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$) y humedad (50 %) controlada, así como con alimentación e hidratación *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los protocolos de investigación aprobados por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología y siguieron los principios éticos de experimentación en animales establecidos por la IASP (*International Association for the Study of Pain*) y la NOM-062-ZOO-1999. Los experimentos conductuales fueron realizados de manera sistemática entre las 10:00-14:00 h.

6.2. Experimentos de trazado neuronal e inmunofluorescencia

6.2.1. Inyecciones de trazador retrógrado (*Fluoro-Gold*®) en la RAIC

Bajo anestesia general (ketamina/xilacina, 70/6 mg/kg, intraperitoneal), se realizó una cirugía estereotáxica para inyectar en la RAIC entre 15 y 20 nl del trazador neuronal *Fluoro-Gold*® (FG) (2.5 % en H₂O destilada) siguiendo las siguientes coordenadas: anteroposterior Bregma 2.2 – 2.7 mm, lateral 4.5- 5.0 mm, y profundidad 5.2- 5.8 mm (Paxinos y Watson, 2007). La microinyección se llevó a cabo por medio de una micropipeta de vidrio (diámetro de punta ~10 µm), acoplado a una jeringa Hamilton de 1 µl y un vernier. Para evitar derrame, la micropipeta de vidrio se mantuvo en su posición por 60 segundos posterior a la administración del volumen; el trepano fue cubierto con cera de hueso y la piel fue suturada.

Al terminar la cirugía, los animales fueron puestos en sus cajas hasta su recuperación, luego se mantuvieron por un periodo de 7 a 10 días antes de ser perfundidos.

Para este fin, se administró una sobredosis de pentobarbital (80 mg/kg vía intraperitoneal) y la perfusión se realizó de forma intracardiaca por medio de una bomba peristáltica con solución salina de NaCl 0.9 % (\approx 200 ml) y posteriormente con una solución de paraformaldehído (PFA; \approx 200 ml) al 4% en 0.1 M buffer de fosfatos (pH 7.4). El tejido cerebral fue extraído y conservado en el mismo fijador por 2 h y luego en solución de sacarosa al 30% por 2 días. Posteriormente, se obtuvieron cortes coronales de 40 μ m de grosor por medio de un micrótopo de congelación (Leica SM2000 R; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). Los cortes fueron almacenados en una solución buffer de fosfatos 0.1 M (dilución 1:3) en cinco series. De ahí, dos series fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados y deshidratadas a través de sumergirlos por 5 segundos en un tren de alcohol a diferentes grados (70%, 80%, 96% y 100%) seguido con una solución de xilol (98.5-100 %) antes de poner un medio de montaje de DPX (resina acrílica no colorante con base de xileno) y cubreobjetos. Posteriormente, fueron observadas en un microscopio de fluorescencia. La tercera serie fue procesada con violeta de cresilo al 0.5% para realizar un control histológico sobre la localización de los sitios de inyección y localización de las células positivas a FG en el PVN. Las dos series restantes se almacenarán en pozos de incubación en la solución anteriormente mencionada para realizar los estudios de inmunofluorescencia en el PVN.

6.2.2. Pruebas de inmunofluorescencia en el PVN contra oxitocina (OT) y *Fluoro-Gold*®

Los cortes fueron lavados con búfer fosfato salino (BFS) (0.1M, 0.9% NaCl) por cinco minutos. La primera incubación (que duro 24 h) se realizó con solución de BFS (2400 μ l, 400 μ l en cada pozo) que contiene los anticuerpos primarios contra OT (anti-neurofisisina,

PS60 monoclonal hecho en ratón, diluido a 1:250; anticuerpo donado por el Dr. Harold Gainer, NIH Bethesda MD, USA) y contra el FG (anti-FG hecho en conejo, diluido a 1:400; Fluorochrome LLC, USA; no. de catálogo 52-9680).

Al día siguiente, los cortes fueron lavados con BFS por 10 minutos. Posteriormente, fueron incubados por 24 h con solución de BFS que contiene los siguientes anticuerpos secundarios (todos obtenidos de Invitrogen™: (i) IgG anti-conejo hecho en burro (Alexa Fluor 555 conjugado; no. de catálogo A31572); e (ii) IgG anti-ratón hecho en burro (Alexa Fluor 488 conjugado; no. de catálogo A21202).

Finalmente, los cortes fueron lavados en una solución de buffer fosfatos 0.1 M (dilución 1:3) y montadas sobre portaobjetos gelatinizados. Posteriormente, los cortes fueron secados (usando alcohol y xilol, como se describió en la sección 6.2.1.) y fueron conservados (usando DPX como medio de montaje) para ser observadas en microscopia confocal, así como la obtención de fotomicrografías.

6.2.3. Inyección de trazador anterógrado (*Fluoro-Ruby*®) en el PVN

Bajo las condiciones anteriormente descritas (sección 5.2.1), se inyectaron de 20 a 40 nl de *Fluoro-Ruby*® (FR) (10 % en H₂O destilada, P.M. 10000 D) en el PVN siguiendo las coordenadas: anteroposterior Bregma -1.4 a -1.6 mm, lateral 0.3- 0.5 mm, y profundidad 7.9- 8.1 mm (Paxinos y Watson, 2007). Los animales se mantuvieron por un periodo de 10 a 13 días antes de su perfusión. Los procesos de perfusión y análisis histológico se realizaron siguiendo los pasos descritos en la sección 6.2.1. Las últimas dos series fueron conservadas para realizar estudios de inmunofluorescencia en la RAIC.

6.2.4. Pruebas de inmunofluorescencia en la RAIC contra GABA y el receptor a oxitocina (OTR)

Los cortes fueron lavados con búfer fosfato salino (BFS) (0.1M, 0.9% NaCl) por cinco minutos. La primera incubación que duró 24 h se realizó con solución de BFS (2400 μ l, 400 μ l en cada pozo) que contiene los anticuerpos primarios contra el OTR (anti-OTR, policlonal hecho en cabra, diluido a 1:400; no. de catálogo sc-8103; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) y contra el GABA (anti-GABA, policlonal hecho en conejo, diluido a 1: 1500; no. de catálogo A2052; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Al día siguiente, los cortes fueron lavados con BFS por 10 minutos.

Posteriormente, fueron incubados por otras 24 h con solución de BFS que contiene los anticuerpos secundarios (todos obtenidos de Invitrogen™; (i) IgG anti-cabra hecho en burro (Alexa Fluor 647 conjugado; no. de catálogo A-21447); e (ii) IgG anti-conejo hecho en burro (Alexa Fluor 488 conjugado; no. de catálogo A-21026).

Finalmente, los cortes fueron lavados en una solución de buffer de fosfatos 0.1 M (dilución 1:3) y montadas sobre portaobjetos gelatinizados. Posteriormente, los cortes fueron secados y conservados (ver sección 5.2.1) para ser observadas en microscopia confocal, así como la obtención de fotomicrografías.

6.3. Microinyecciones de oxitocina (OT) en la RAIC y evaluación de la nocicepción

6.3.1. Experimentos conductuales parte 1: prueba de la formalina

6.3.1.1. Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar el efecto de la microinyección de OT en la RAIC sobre la nocicepción, se realizó la prueba de la formalina. 24 h previas al día del experimento, los

animales fueron habituados en cajas de acrílico transparente por una hora. El día del experimento las ratas fueron habituadas por 30 minutos en las mismas cajas antes de realizar el procedimiento quirúrgico.

Bajo anestesia general (sevoflorano al 6%; en una mezcla de $\frac{3}{4}$ N₂O y $\frac{1}{4}$ O₂), los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para posicionar una micropipeta de vidrio en la RAIC (ver sección 5.2.1. para coordenadas estereotáxicas) a través del cual se realizó la microinyección de los distintos tratamientos. Posteriormente, el electrodo fue retirado y la piel fue suturada e infiltrada de forma local a través de una inyección subcutánea de 1 ml de lidocaína (10%), esto con el fin de disminuir el dolor postquirúrgico relacionado a la cirugía. Al terminar la cirugía, los animales fueron puestos en las cajas acrílicas para su recuperación y 15 minutos después se sometieron a la prueba de la formalina. De forma breve, se inyectó subcutáneamente 50 µl de formalina (5%) en el dorso de la pata trasera contralateral (al sitio de microinyección en la RAIC), y se realizó el conteo del número de sacudidas de pata por un minuto cada 5 minutos por una hora de acuerdo con lo establecido por Dubuisson y Dennis (1977) y detallada por Wheeler-Aceto y Cowan (1991).

En el primer set experimental (n=24), los animales fueron divididos en cuatro grupos: (i) un grupo control en el cual se realizó el procedimiento quirúrgico sin inyectar ningún volumen; (ii) un grupo vehículo donde se inyectó 40 nl de solución salina (NaCl, 0.9%); (iii) un grupo que fue pretratado con 40 pmol de OT (40 nl); y (iv) un grupo que fue pretratado con 400 pmol de OT (40 nl). Quince minutos después, los animales fueron sometidos a la prueba de formalina (5%).

En la segunda etapa, se analizaron los posibles mecanismos del efecto aninocectivo inducido por la OT en la RAIC. Bajo las condiciones experimentales descritas, los animales (n=24) fueron divididos en 4 grupos: (i) en el primer grupo se inyectó solución salina (80 nl)

en la RAIC; (ii) el segundo grupo fue pretratado con L-368,899 (antagonista al receptor de oxitocina [OTR]; 400 pmol/40 nl) en la RAIC; (iii) el tercer grupo recibió bicuculina (antagonista al receptor GABA_A; 200 pmol/40 nl) en la RAIC); y (iv) en el cuarto grupo, se inyectó intratecalmente BRL 44408 (antagonista de receptores noradrenérgicos α_{2A} ; 1nmol/10 μ l). Diez minutos después de la administración de los distintos antagonistas, se microinyectaron 400 pmol/40 nl de OT en la RAIC. Quince minutos después, los animales fueron sometidos a la prueba de formalina (5%).

En la tercera etapa de esta sección se averiguó el efecto *per se* de los antagonistas utilizados en los experimentos previos. Los animales (n=18) se dividieron en 3 grupos: (i) en el primer grupo se administró L-368,899 (200 pmol/ 40 nl); en (ii) el segundo grupo se administró bicuculina (200 pmol/ 40 nl), ambos en la RAIC; mientras que (iii) en el tercer grupo se inyectó BRL 44408 (1nmol/10 μ l) de forma intratecal. 15 minutos posterior a terminar la cirugía, se realizó la prueba de formalina (5%).

Al final de la prueba de la formalina, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (45 mg/kg vía intraperitoneal), y fueron perfundidos de forma intracardiaca por medio de una bomba peristáltica con solución salina (\approx 200 ml) y posteriormente con una solución de formaldehido (\approx 200 ml) al 10% en solución salina (NaCl, 0.9%). El cerebro fue extraído y conservado en el mismo fijador hasta realizar la verificación de los sitios de inyección en la RAIC. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales del cerebro de 40 μ m de grosor por medio de un micrótopo de congelación (Leica SM2000 R; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) y fueron observados en un microscopio de luz para verificar los sitios de inyección en la RAIC.

La inyección intratecal se llevó a cabo a través de una punción lumbar directa (espacio intervertebral L5-L6), usando una aguja (22 G) acoplada a una jeringa Hamilton® de 25µl, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito por Mestre *et al.*, (1994) Consecutivamente, la piel fue suturada y localmente infiltrada con lidocaína (10%). 15 minutos después, los animales fueron sometidos a la prueba de formalina (5%) como se describió anteriormente.

6.3.1.2. *Análisis de los resultados obtenidos.*

Los datos son presentados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Las curvas representan el curso temporal del número de sacudidas de pata inducido por la formalina (0-60 min) (n=6, en cada grupo). Se calculó el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales obtenidos usando el método de los trapezoides; el ABC se considera una expresión de la duración y la intensidad del efecto inducido por los distintos tratamientos. La disminución en el ABC (con respecto al control) inducida por cualquier tratamiento fue considerada como un efecto antinociceptivo. El efecto de diferentes tratamientos fue comparado usando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Las varianzas entre grupos fueron analizadas por medio de la prueba de Brown-Forsythe seguida con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05.

6.3.2. Experimentos conductuales parte 2: prueba de coordinación motora

6.3.2.1. *Diseño experimental*

En esta sección experimental se evaluó el efecto de la microinyección de OT en la RAIC sobre la coordinación motora para excluir la presencia que una alteración motora que puede

afectar la interpretación de los datos obtenidos en la primera parte de los estudios conductuales. Los animales (n=20) fueron sometidos a una prueba de coordinación motora (*rotarod*) usando un aparato de rueda (IITC Inc. Life Science, Los Angeles, CA). De manera resumida, tres días anteriores al día de la prueba, los animales fueron entrenados para mantenerse sobre un cilindro (diámetro de 7 cm) rotando a una velocidad constante de 15 revoluciones por minuto (tiempo de corte: 180 segundos), por tres sesiones, sin recibir ningún tratamiento. Posteriormente, los animales fueron divididos en cuatro grupos; (i) grupo control, en el cual no se realizó ninguna intervención quirúrgica; (ii) grupo sham que recibió el mismo tratamiento quirúrgico mencionado en la sección 5.3.1.1. sin inyectar ningún volumen en la RAIC; (iii) grupo vehículo, donde se inyectaron 40 nl de solución salina (NaCl, 0.9%) en la RAIC; y (iv) grupo OT, donde se inyectó OT (40 pmol/40 nl) en la RAIC. Quince minutos después, los animales fueron puestos sobre el cilindro y se midió el tiempo de latencia en caer del cilindro.

Después de la prueba, los animales fueron sacrificados para realizar la verificación de los sitios de inyección en la RAIC (ver sección 5.3.1.1.).

6.3.2.2. Análisis de los resultados obtenidos.

Los datos son presentados como la media \pm el EEM del tiempo de latencia de cada grupo (n=5, en cada grupo). El efecto de los diferentes tratamientos fue comparado usando la prueba de ANOVA de una vía. Las varianzas entre grupos fueron analizadas por medio de la prueba de Brown-Forsythe seguida con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05.

6.3.3. Experimentos electrofisiológicos

6.3.3.1. Registro extracelular unitario de neuronas de amplio rango dinámico (WDR)

En esta sección se evaluó el efecto de la microinyección de OT en la RAIC sobre la actividad neuronal “espontánea” de las neuronas de amplio rango dinámico (WDR) espinales a nivel lumbar ante la administración periférica de formalina (1%). La formalina se administró de forma subcutánea en el campo receptivo somático de la neurona WDR registrada.

6.3.3.2. Diseño experimental

Los animales (n=12) fueron anestesiados con sevoflurano (8%) (en una mezcla de $\frac{3}{4}$ N₂O y $\frac{1}{4}$ O₂) dentro de una caja de plástico. Posteriormente, se realizó una traqueostomía para ventilación artificial que fue mantenida con sevoflurano (2-2.5 %) a lo largo del experimento. Los animales fueron montados sobre un aparato estereotáxico y su temperatura corporal se mantuvo en 37 grados por media de una almohadilla térmica. El nivel de CO₂ espirado fue monitoreado por medio de un analizador de CO₂ (modelo: MM206, Artema Medical, Sweden), y mantenido entre 1.8-3%. A nivel espinal, se realizó una laminectomía (a nivel de L3-L5) para exponer la médula espinal.

Los registros unitarios de las neuronas de amplio rango dinámico (WDR) fueron realizados por medio de micropipetas de vidrio (4 - 8 MΩ) llenadas con pontamina 4 % (1 M en solución de KCl). Las micropipetas fueron bajadas cuidadosamente (200 - 1000 μm) en las láminas del asta dorsal de la médula espinal usando un micromanipulador hidráulico (David Kopf Instruments, USA). Por cada neurona registrada, el campo receptivo somático fue localizado por medio de golpeteo y presión ligera sobre la pata trasera ipsilateral, seguida con la estimulación eléctrica periférica.

Para este fin, dos agujas (27 G) conectados a una unidad de estimulación aislada (SIU6; Grass Instruments Co., Quincy, Mass. USA) fueron insertadas subcutáneamente en el campo receptivo somático de la neurona registrada. Después, la estimulación eléctrica fue realizada por medio de un estimulador eléctrico (S88 Stimulator; Grass Instruments Co., Quincy MA, USA). Esta estimulación consistió en 10 estímulos cuadrados a 0.2 Hz, con duración de 1-mseg e intensidad de 0.4-0.6 mA.

La respuesta neuronal evocada fue amplificada $\times 1000$ (P511 series AC Pre-amplifier, Grass Instruments Co., Quincy, Mass. USA), digitalizada, y discriminada usando un hardware CED y el software Spike2 v5.15 (Cambridge Electronic Design, UK). La señal digitalizada y la actividad registrada fueron almacenados en un disco duro para analizarlos en modo *off-line*. La actividad basal y respuestas evocadas de las neuronas WDR fueron registrados y analizados como: (i) un histograma de tiempo peri-estímulo; y (ii) actividad neuronal espontánea. Los histogramas de tiempo peri-estímulo se usaron para identificar los potenciales de acción correspondientes a la actividad neuronal mediada por fibras A β - (0-20 ms), A δ - (20-90 ms) y C (90-350 ms) evocada por 10 estímulos eléctricos en el campo receptivo somático de la neurona registrada.

Bajo estas condiciones experimentales se realizaron dos registros control de la actividad neuronal evocada por la estimulación eléctrica periférica. En caso de obtener una variación no mayor al 10% entre los dos controles, el registro se consideraba adecuado para realizar el procedimiento experimental. Se registraron 12 neuronas WDR divididos en dos grupos; (i) control (n=6) donde se inyectaron 50 μ l de formalina (1%) en el campo receptivo somático en la pata trasera (ipsilateral al sitio de registro); y (ii) OT (n=6), donde 40 pmol de OT/40 nl fueron inyectados en la RAIC (contralateral al sitio de registro) 5 minutos antes de la administración de formalina (1%; 50 μ l).

Posterior a la administración periférica de la formalina, se obtuvieron registros de la actividad neuronal “espontánea” por un minuto cada 5 minutos a lo largo de 60 min. Al fin de cada registro, se aplicaron 10 estímulos eléctricos periféricos en el campo receptivo, con el fin de asegurar la presencia de la respuesta neuronal evocada y asegurar que los cambios en la actividad neuronal espontánea se deben a un efecto específico inducido por OT.

Al fin del registro, los animales se perfundieron de forma intracardiaca por medio de una bomba peristáltica con solución salina (NaCl, 0.9%) (≈ 200 ml) y posteriormente con una solución de formaldehído (≈ 200 ml) al 10%. El cerebro fue extraído y conservado en el mismo fijador para analizar los sitios de inyección en la RAIC.

6.3.3.3. Análisis de los resultados obtenidos

Los datos son presentados como la media \pm EEM. La curva representa el curso temporal de la frecuencia de actividad neuronal “espontánea” (Hz) (0-60 min) (n=6, en cada grupo). El área bajo la curva (ABC) fue calculada por medio de la regla trapezoidal. El efecto de diferentes tratamientos fue comparado usando la prueba *t* no pareada (bilateral). La diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando el valor de *p* fue menor a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1. Trazado de la vía neuronal entre la RAIC y el PVN

7.1.1. La microinyección de *Fluoro-Gold*® en la RAIC marca bilateralmente células del PVN

El FG inyectado en la RAIC (Figura 2A-2B) (n=3) marcó células de manera bilateral en el PVN (Figura 2C-2D). En contraste, la inyección de FG fuera de la RAIC (*off-site*) no fue relacionada con la presencia de células positivas a FG en el PVN (control negativo). Adicionalmente, se pudo apreciar la presencia de células positivas a FG en los núcleos talámicos mediales, el hipotálamo lateral, así como la AMG basolateral cuando el FG fue inyectado en la RAIC, esto confirma la precisión de los sitios de inyección considerando que resultados previos han establecido una conexión anatómica entre la RAIC y las estructuras antes mencionadas (control positivo) (Jasmin *et al.*, 2004).

Por último, las células positivas a FG en el PVN se presentaron de forma predominante en la porción medial del núcleo y tenían un tamaño ~15 µm. Estos datos sugieren que dichas células forman parte de la población parvocelular del PVN (van den Pol, 1982). La Figura 2E representa un ejemplo de la distribución de las células positivas a FG a lo largo del PVN.

7.1.2. La microinyección de *Fluoro-Ruby*® en el PVN marca bilateralmente fibras en la RAIC

Posteriormente, la inyección de FR en el PVN (n=3) (Figura 2F) fue asociada con la presencia de fibras marcadas en la RAIC de forma bilateral (Figura 2G-H). Los datos obtenidos de los trazados neuronales tanto retrogrado como anterógrado confirman la presencia de una conexión anatómica entre el PVN y la RAIC.

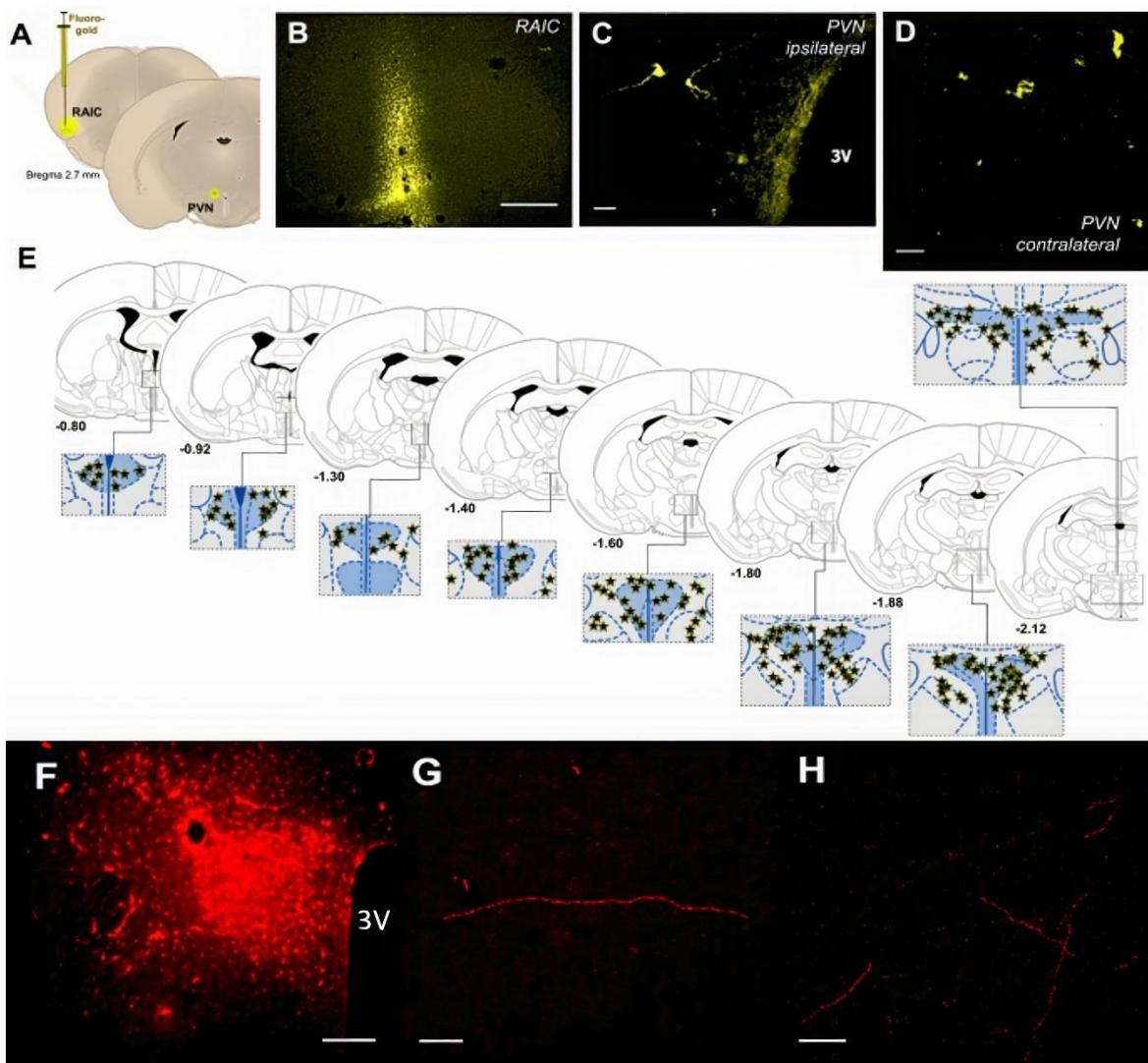


Figura 2. Proyecciones neuronales del PVN hacia la RAIC. (A) Esquema ilustrando el sitio de inyección del FG en la RAIC y las células marcadas con FG en el PVN (en amarillo). En (B) se muestra una fotomicrografía del sitio de inyección de FG en la RAIC (escala: 100 μ m). En los paneles (C) y (D) se muestran fotomicrografías representativas de células marcadas con FG dentro del PVN (escala: 50 μ m y 60 μ m, respectivamente). (E) Mapeo de la distribución de las células marcadas con FG a lo largo de la extensión del PVN donde se aprecia la presencia de células positivas a FG de forma bilateral. (F) Fotomicrografía del sitio de inyección de FR en el PVN (escala: 120 μ m), (G) y (H) demuestran las fibras marcadas con FR en la RAIC (escala: 60 μ m en todos los casos).

7.2. Las inervaciones oxitocinérgicas del PVN hacia la RAIC

7.2.1. Las células del PVN que proyectan a la RAIC son marcadas con inmunofluorescencia a oxitocina (OT)

En el PVN, los estudios de inmunofluorescencia revelaron la presencia de células positivas a FG y OT (doble marcaje), es decir, algunas células que proyectan hacia la RAIC son también oxitocinérgicas (n=3) (Figura 3A-3F). En este caso, aproximadamente el 29% de las neuronas del PVN que proyectan a la RAIC son de naturaleza oxitocinérgica (n=3) (Figura 3G).

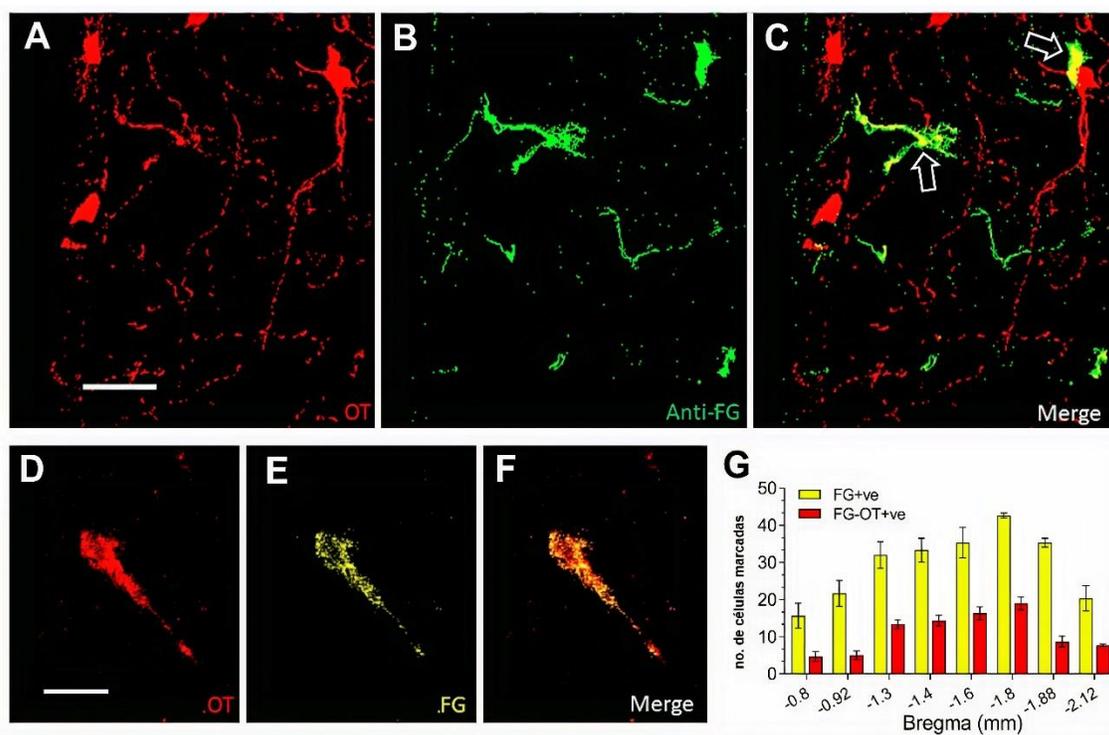


Figura 3. Células oxitocinérgicas en la inervación del PVN a la RAIC. En (A) se aprecia las células marcadas con el anticuerpo a OT en rojo. En (B) se observan las células marcadas con el anticuerpo a FG en verde. En (C) las flechas blancas señalan las células con doble marcaje (en amarillo), es decir positivas a OT y a FG. En (D) se observa una célula marcada con OT, que también es positiva a FG (E); el panel (F) es el empalme mostrando que la célula es positiva a OT y FG (doble marcaje). (G) cuantificación de las células marcadas con FG positivas a OT a lo largo del PVN.

7.3. Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la nocicepción

7.3.1. Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) sobre la nocicepción inducida por la formalina

La administración periférica de formalina (5%) induce sacudidas de pata; dicha conducta sigue un patrón bifásico, primero un incremento y caída drástica (fase 1: 0-10 min), seguido de un aumento de manera gradual llegando a su pico al minuto 30 antes de disminuir (fase 2: 10-60 min). La microinyección de OT (40 pmol/40 nl) en la RAIC disminuyó el número de sacudidas de pata inducidas por la formalina (Figura 4A). Esta disminución fue más evidente con el aumento de la concentración de OT inyectada (400 pmol/40 nl) (Figura 4B). El cálculo del área bajo la curva (ABC) demuestra una diferencia significativa entre los dos grupos de animales pretratados con OT en la RAIC contra el grupo vehículo; es decir, la inyección de OT en la RAIC produjo un efecto antinociceptivo (Figura 4C-4D). Cabe mencionar que no hubo una diferencia significativa entre el grupo tratado con salina en la RAIC y el grupo control. Algunos ejemplos de los sitios de inyección en la RAIC se muestran en la Figura 4E.

7.3.2. Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la coordinación motora

Para excluir una alteración motora inducida por la microinyección de OT, evaluamos la coordinación motora de los animales por medio de la prueba de *rotarod*. Los resultados muestran que los animales que recibieron el procedimiento quirúrgico (grupos sham, vehículo y OT) tuvieron un menor tiempo en caer del cilindro (Figura 4F). Sin embargo, el pretratamiento con OT en la RAIC mejoró la latencia en comparación con los grupos sham

y vehículo. Estos datos sugieren que la disminución en el tiempo de latencia es debida al efecto del tratamiento quirúrgico y no a la microinyección de OT en la RAIC.

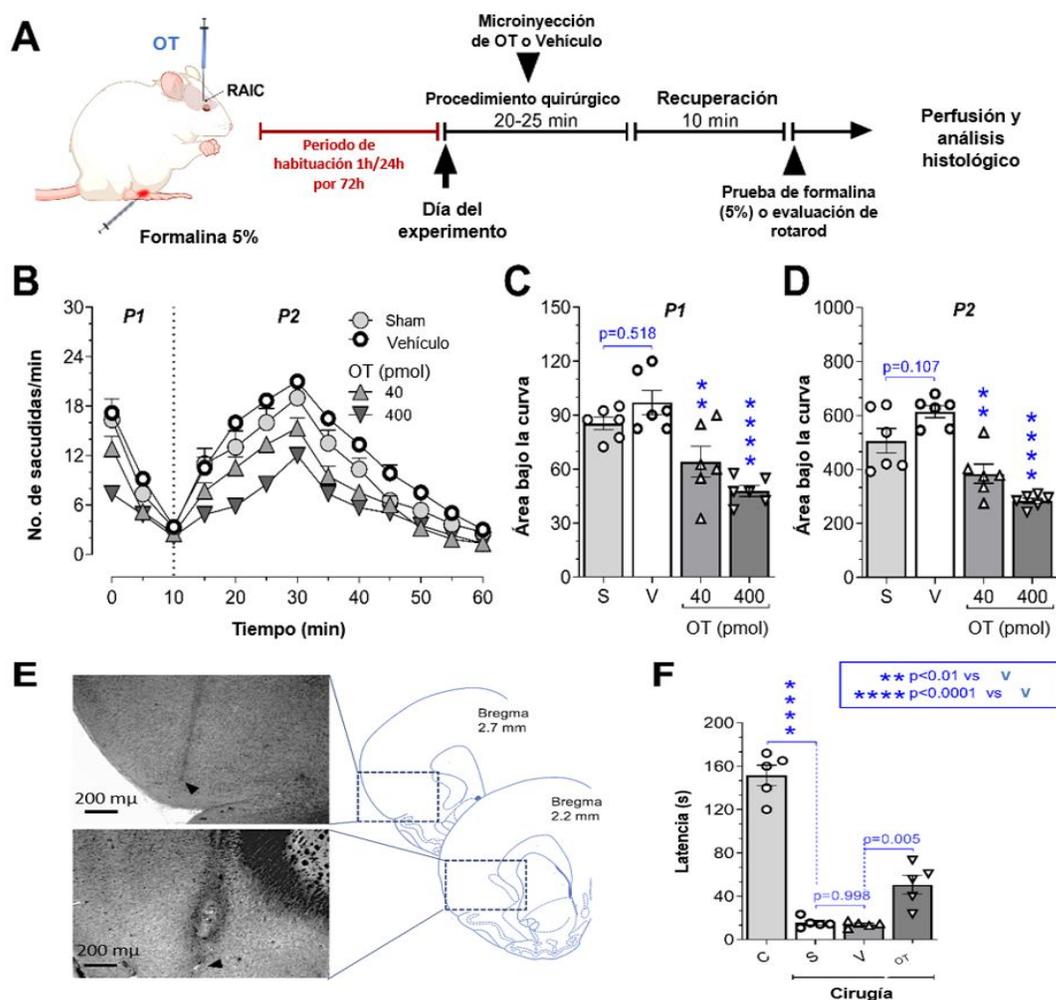


Figura 4. La microinyección de OT en la RAIC produce antinocicepción sin alteraciones en la coordinación motora. (A) Diseño experimental de la evaluación conductual. (B) Curso temporal del número de sacudidas de la pata inducida por formalina (5%) en los distintos grupos donde se aprecia que los animales pretratados con OT (40 o 400 nmol/40 nl) en la RAIC disminuye el número de sacudidas. Área bajo la curva (ABC) de la fase 1 (C) y de la fase 2 (D) de la prueba de la formalina; la OT disminuye el ABC en ambas fases de la prueba. (E) fotomicrografías que ilustran los sitios de inyección de OT en la RAIC (escala: 200 μm en ambas), así como esquemas del Paxinos y Watson (2007) mostrando sus coordenadas estereotáxicas. (F) Resultados de la evaluación de rotarod donde se aprecia la disminución en el tiempo que pasaron los animales sobre el cilindro en rotación en todos los grupos que

fueron sometidos a la cirugía estereotáxica (s: sham; v: vehículo; OT: oxitocina). Los animales pretratados con OT se mantuvieron más tiempo antes de caerse del cilindro en comparación con los grupos sham y vehículo.

7.3.3. Efecto de la microinyección de oxitocina (OT) en la RAIC sobre la actividad neuronal “espontánea” de las neuronas WDR espinales

El diseño experimental para el registro de neuronas de WDR a nivel espinal se muestra en la Figura 5A. Las neuronas registradas mostraron una respuesta específica ante el golpeteo y la presión en su campo receptivo somático, así como a la estimulación eléctrica periférica. En todos los registros electrofisiológicos, la estimulación eléctrica induce una respuesta neuronal típica donde se observa la actividad neuronal asociada a la activación de fibras A β , A δ y C (Figura 5B-5G). En este caso, la inyección de formalina (1%) en el campo receptivo periférico de las neuronas WDR incrementó su actividad “espontánea” (Figura 5H-5I).

Es interesante notar que la administración de formalina evoca una respuesta neuronal bifásica similar a la observada en el caso de los experimentos conductuales (Figura 6A). En este sentido, el pretratamiento con OT disminuyó la frecuencia “espontánea” de disparo de las neuronas WDR que se induce por la administración de formalina (Figura 6A-6D). Dicho efecto antinociceptivo se observa tanto en la fase 1 como fase 2 de la respuesta neuronal “espontánea” inducida por formalina. Es importante señalar que la respuesta neuronal mediada por fibras A δ y C evocada por la estimulación eléctrica periférica se mantuvo a lo largo del registro (Figura 6E); esto sugiere que la disminución de la actividad neuronal inducida por la OT es debido a un efecto descendente específico que genera la OT en la RAIC y no es debido a un error metodológico (neurona perdida). Estos datos sugieren que la OT en la RAIC promueve un mecanismo descendente inhibitorio a nivel espinal.

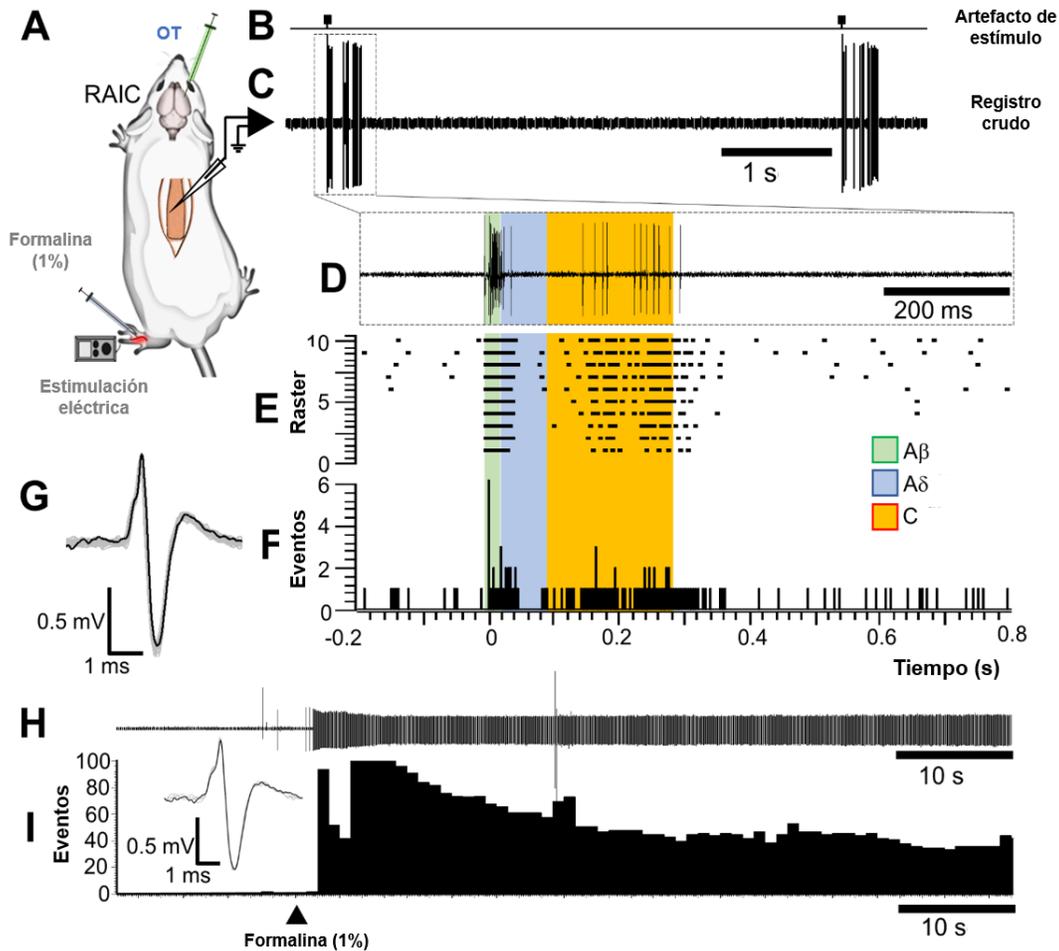


Figura 5. Registro de neuronas de amplio rango dinámico (WDR) espinales y su respuesta a la inyección periférica de formalina. (A) Diseño experimental para el registro de la actividad de neuronas WDR. La OT fue inyectada en la RAIC contralateral al sitio de registro. En (B) se muestra el artefacto de estimulación eléctrica, y en (C) se muestra el registro crudo de la actividad neuronal evocada por la estimulación eléctrica periférica. En (D) se muestra una ampliación del registro electrofisiológico. Los paneles (E) y (F) representan el raster-plot y el histograma temporal peri-estímulo obtenidos al aplicar 10 estímulos eléctricos periféricos donde se puede apreciar una respuesta mediada por fibras $A\beta$, $A\delta$ y C. En (G) el promedio de la onda de la actividad neuronal WDR evocada por la estimulación eléctrica. El panel (H) muestra un registro electrofisiológico crudo de una neurona WDR espinal antes y después de la administración de formalina (50 μ l), mientras que en (I) se muestra el histograma temporal correspondiente; es importante señalar que el promedio de actividad neuronal espontánea es similar al que se evoca eléctricamente.

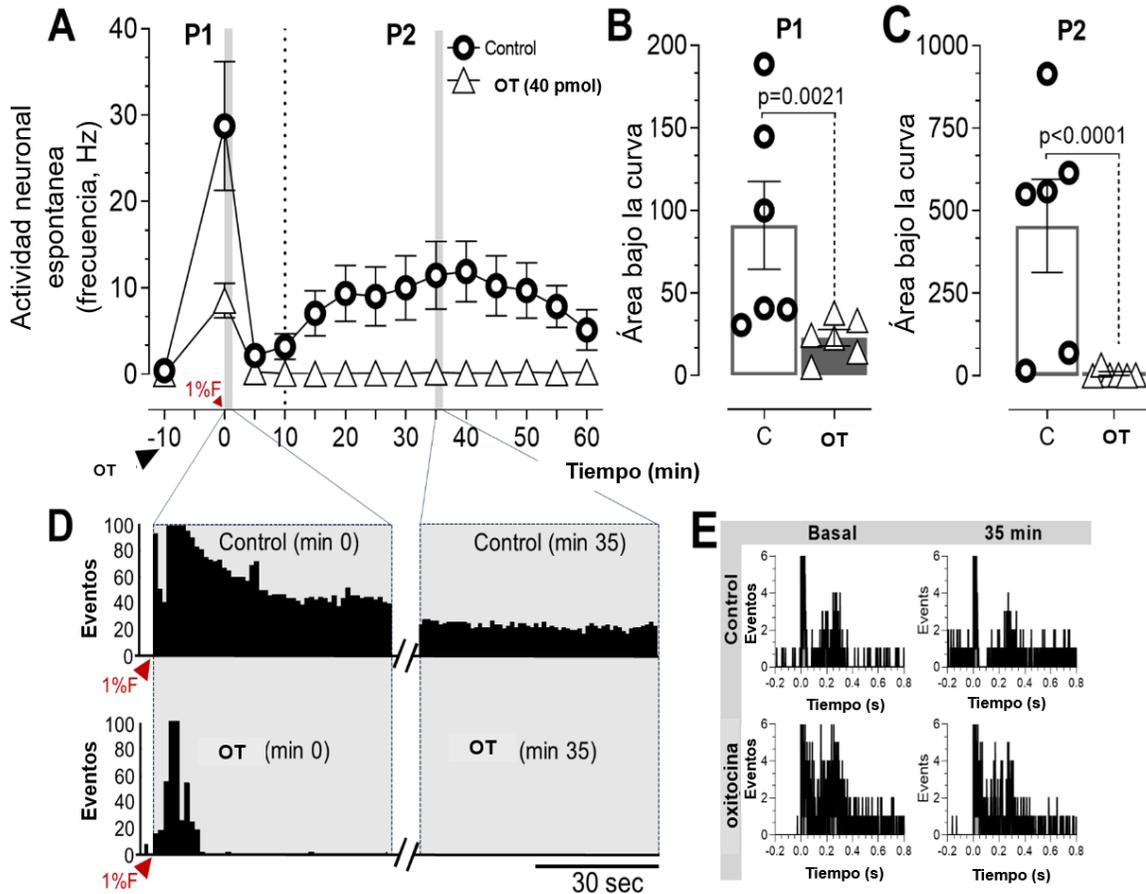


Figura 6. La microinyección de OT en la RAIC disminuye la actividad de neuronas WDR inducida por la formalina (A) Curso temporal de la frecuencia de disparo neuronal de neuronas WDR ante la administración periférica de formalina (1%) en su campo receptivo somático. La microinyección de OT en la RAIC antes de la administración de formalina disminuye la respuesta neuronal “espontánea”. (B) y (C) muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal en (A); se observa una disminución en la respuesta neuronal “espontánea” en el grupo pretratado con OT en la RAIC. (D) Histogramas de la actividad neuronal “espontánea” después de la administración periférica de formalina en diferentes tiempos del registro; se observa el aumento de la actividad neuronal en el grupo control en comparación con el grupo OT bajo las mismas condiciones experimentales. (E) los histogramas temporales peri-estímulo de la respuesta de neuronas WDR obtenidos al aplicar estímulos eléctricos periféricos al minuto 1 y 35 después de la administración de formalina; es importante señalar que, aunque la actividad neuronal “espontánea” disminuyó en el grupo pretratado con OT, la actividad neuronal evocada seguía presente a lo largo del registro electrofisiológico.

7.4. Participación de los receptores OTR, GABA_A o α_{2A} -adrenérgicos en la antinocicepción inducida por la oxitocina (OT)

7.4.1. Efecto del bloqueo de los receptores a oxitocina (OTR), GABA_A o α_{2A} -adrenérgicos en la antinocicepción inducida por oxitocina (OT)

En esta parte, investigamos si el efecto antinociceptivo inducido por la OT es mediado por OTR reclutando un mecanismo GABAérgico, lo cual incluye la activación de los receptores GABA_A en la RAIC. A su vez, dicho mecanismo puede desinhibir al LC promoviendo una inhibición descendente noradrenérgica a nivel espinal como fue descrito por Jasmin *et al.*, (2003).

Por este motivo, se observó el efecto del pretratamiento con L-368,899 (antagonista al OTR, 400 pmol/40 nl) o bicuculina (antagonista al receptor GABA_A, 200 pmol/40 nl) en la RAIC sobre la antinocicepción inducida por la OT (400 pmol/40 nl). Adicionalmente, se evaluó el efecto de la microinyección intratecal del BRL 44408 (antagonista del receptor α_{2A} -adrenérgicos; 1 nmol/10 μ l) sobre el efecto antinociceptivo inducido por OT en la RAIC (Figura 7A). Los resultados muestran que el pretratamiento con L-368,899 o bicuculina en la RAIC, abolen el efecto antinociceptivo inducido por la OT. Mientras que, la inyección intratecal de BRL 44408 bloquea parcialmente el efecto de la OT, este bloqueo se puede observar solamente en la segunda fase de la prueba de formalina (Figura 7B-7D).

7.4.2. Efecto *per se* de los antagonistas a los receptores a oxitocina (OTR), GABA_A o α_{2A} -adrenérgicos sobre la nocicepción inducida por la formalina

Posteriormente se evaluó el efecto *per se* de los antagonistas usados sobre la nocicepción inducida por formalina (5%). La administración de bicuculina (en la RAIC) o el BRL 44408 (intratecal) no afectaron el número de sacudidas de pata inducidas por formalina. Por otra

parte, la inyección *per se* de L-368,899 en la RAIC aumentó el número de sacudidas, es decir, un efecto pronociceptivo (Figura 7E-G). Estos datos sugieren una liberación tónica de OT en la RAIC en presencia de un estímulo nocivo inflamatorio. En su conjunto, los datos obtenidos de los experimentos conductuales sugieren que la OT en la RAIC produce un efecto antinociceptivo que está mediado por OTR, el cual promueve un mecanismo GABAérgico local mediado por los receptores GABA_A. Dicho mecanismo induce la desinhibición de LC y da paso a una inhibición descendente noradrenérgica a nivel espinal.

7.4.3. Las células de proyecciones del PVN destinan neuronas GABAérgicas y células que expresan OTR en la RAIC

En la RAIC, según los datos obtenidos por los estudios de inmunofluorescencia, las fibras provenientes del PVN (positivas a FR) tienen una relación cercana con neuronas que expresan OTR (Figura 8A), así como, neuronas GABAérgicas en la RAIC (Figura 8B-8C). Dichas fibras se dirigen a algunas neuronas GABAérgicas que parecen expresar OTR (Figura 8D-8E).

Los datos obtenidos en esta sección demuestran que parte de las proyecciones del PVN destinan neuronas GABAérgicas locales que expresan OTR sugiriendo la posible participación de estos elementos en el efecto inducido por la OT en la RAIC en apoyo a los resultados anteriormente mencionados por medio de las pruebas farmacológicas.

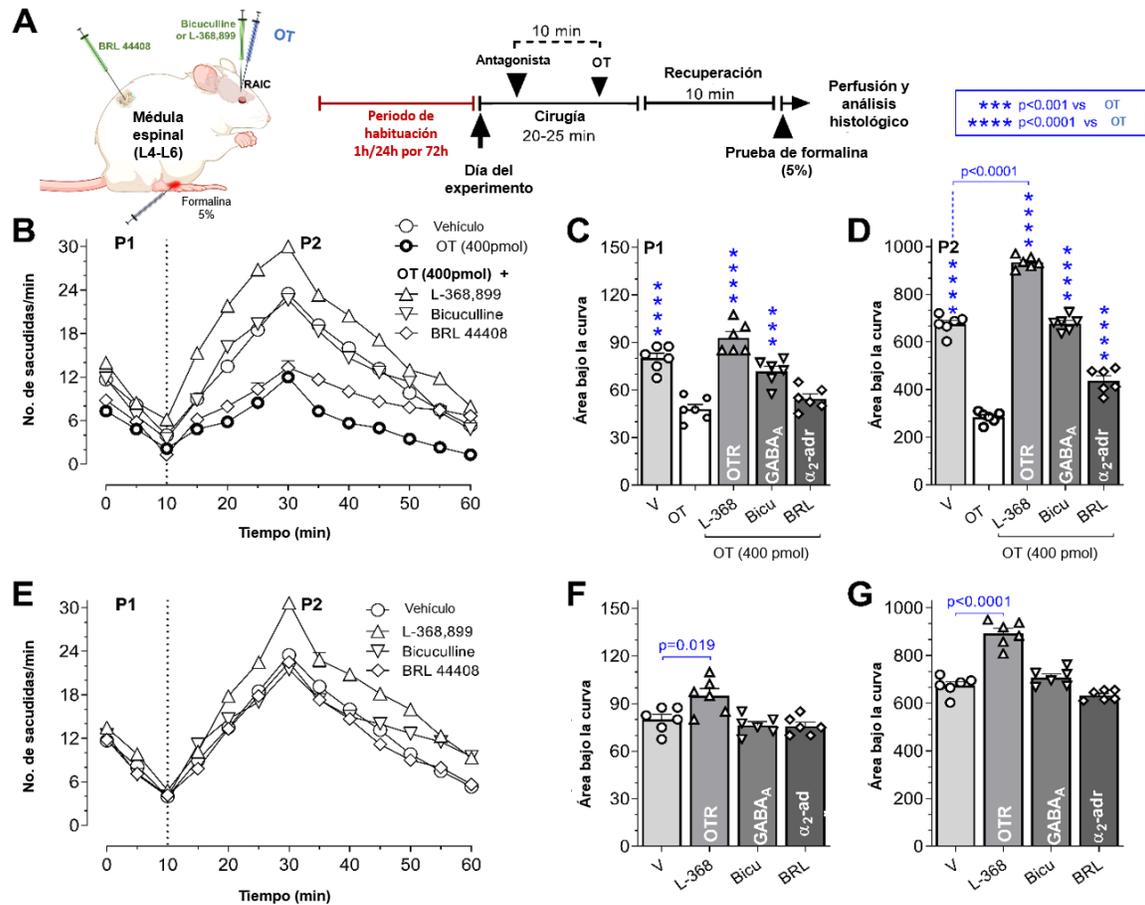


Figura 7. Posible mecanismo del efecto antinociceptivo inducido por OT en la RAIC. (A) Diseño experimental para la evaluación conductual por medio de la prueba de formalina (5%). (B) Curso temporal del número de sacudidas de la pata inducida por formalina en los distintos grupos donde se aprecia que los grupos tratados con L-368,899 o bicuculina en la RAIC bloquea la antinocicepción inducida por OT. En el área bajo la curva (ABC) de la fase 1 (C) y de la fase 2 (D) se observa que con L-368,899 o bicuculina en RAIC se revierten el efecto antinociceptivo inducido por OT en la RAIC, mientras el grupo tratado con BRL 44408 demuestra una reversión parcial (diferencia significativa vs OT en la segunda fase). (E) Curso temporal del número de sacudidas de la pata inducida por formalina en los distintos grupos pretratados con los antagonistas L-368,899, bicuculina o BRL 44408; el grupo tratado con L-368,899 incrementa per se el número de sacudidas de pata. Las ABC de la fase 1 (F) y fase 2 (G) muestran que el pretratamiento con L-368,899 en la RAIC incrementa per se el número de sacudidas de pata.

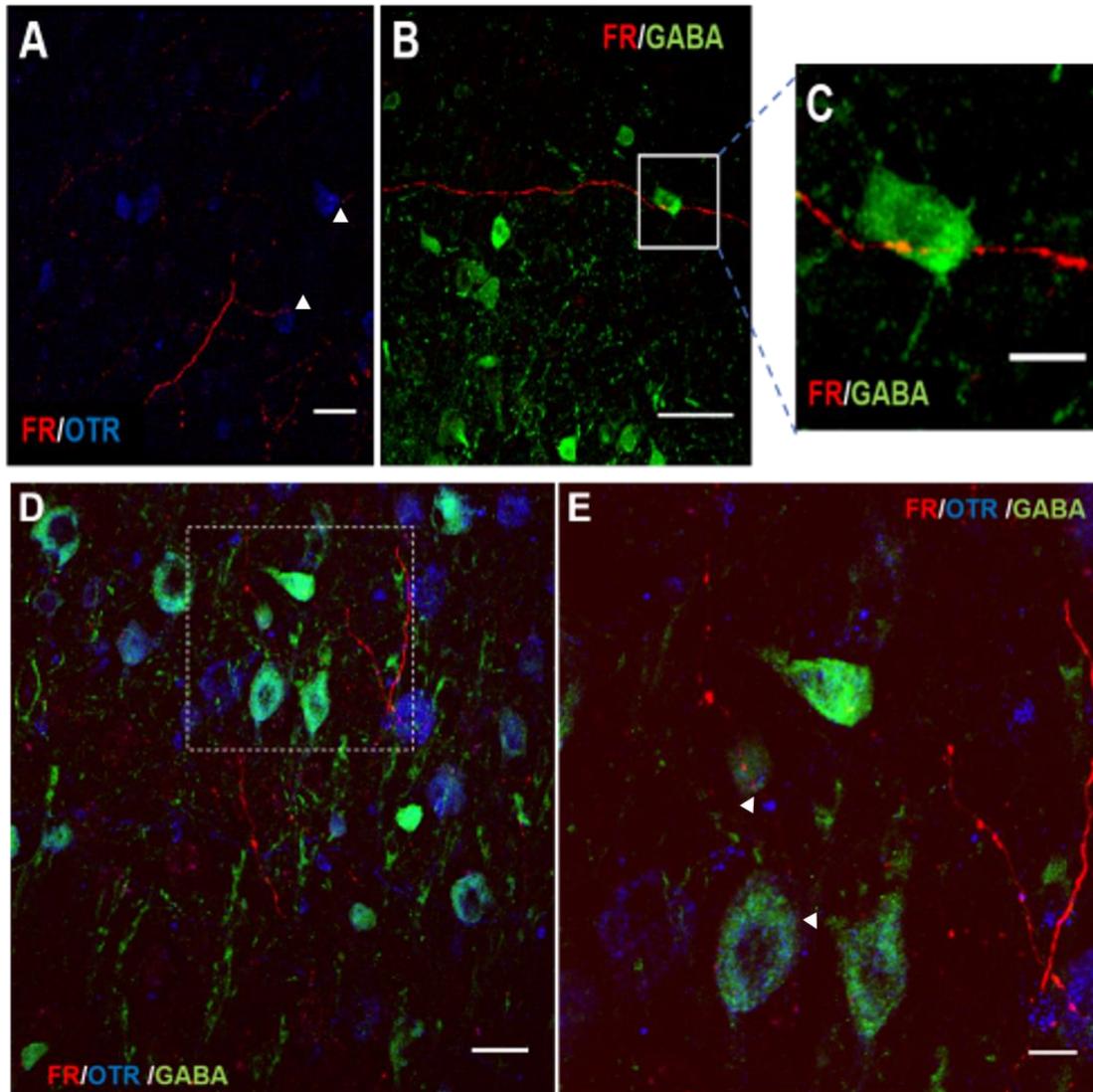


Figura 8. Las proyecciones del PVN destinan neuronas GABAérgicas y células que expresan el receptor a oxitocina (OTR) en la RAIC. (A) Se observa la expresión de OTR en azul y las fibras marcadas con FR en rojo (escala: 60 μm), (B) se observa la relación entre las fibras marcadas con FR en rojo y unas células GABAérgicas marcadas en verde dentro de la RAIC (escala: 60 μm). El panel (C) es un acercamiento de (B) donde se puede apreciar la cercanía entre la fibra proveniente del PVN y una neurona GABAérgica dentro de la RAIC (escala: 30 μm). (D) una fotomicrografía de microscopía confocal en la RAIC donde se muestra en rojo las fibras marcadas con FR, en verde las neuronas GABAérgicas y en azul la expresión del OTR (escala: 50 μm). El panel (E) es un acercamiento de (D) donde las flechas blancas señalan áreas de colocalización entre los tres canales (escala: 20 μm).

8. DISCUSIÓN

Los resultados muestran la presencia de una conexión anatómica entre el PVN y la RAIC, donde algunas neuronas hipotalámicas oxitocinérgicas destinan células GABAérgicas corticales que expresan OTR. Adicionalmente, la microinyección de OT en la RAIC produce un efecto antinociceptivo en presencia de un estímulo nocivo inflamatorio (*i.e.* formalina), dicho efecto es mediado por la activación de OTR que promueve una actividad GABAérgica local mediada por los receptores GABA_A. Estos datos sugieren que la OT a nivel cortical promueve una modulación descendente parcialmente mediado por la activación de los receptores α_{2A} -adrenérgicos a nivel espinal. La Figura 9 ilustra como es que la OT en la RAIC podría estar modulando la nocicepción a partir de los hallazgos obtenidos en el presente trabajo.

8.1. Las proyecciones oxitocinérgicas del PVN hacia la RAIC y la posible participación de otros péptidos.

Chini *et al.*, (2017) describieron que neuronas hipotalámicas oxitocinérgicas proyectan por medio de axones largos hacia diferentes estructuras del prosencéfalo donde se libera OT. Así mismo, proyecciones oxitocinérgicas del PVN hacia la porción posterior de la corteza insular han sido documentadas (Knobloch *et al.*, 2012), sin embargo, los autores de dicho trabajo no describieron su presencia en la corteza insular anterior, tal vez por la falta de su relación con la respuesta neuronal ante el miedo, siendo el tema de su abordaje experimental (Knobloch *et al.*, 2012). De acuerdo con estos hallazgos, nuestros resultados demuestran que neuronas del PVN proyectan, de forma bilateral, hacia la RAIC (Figura 2), asimismo, algunas de estas neuronas son oxitocinérgicas (Figura 3).

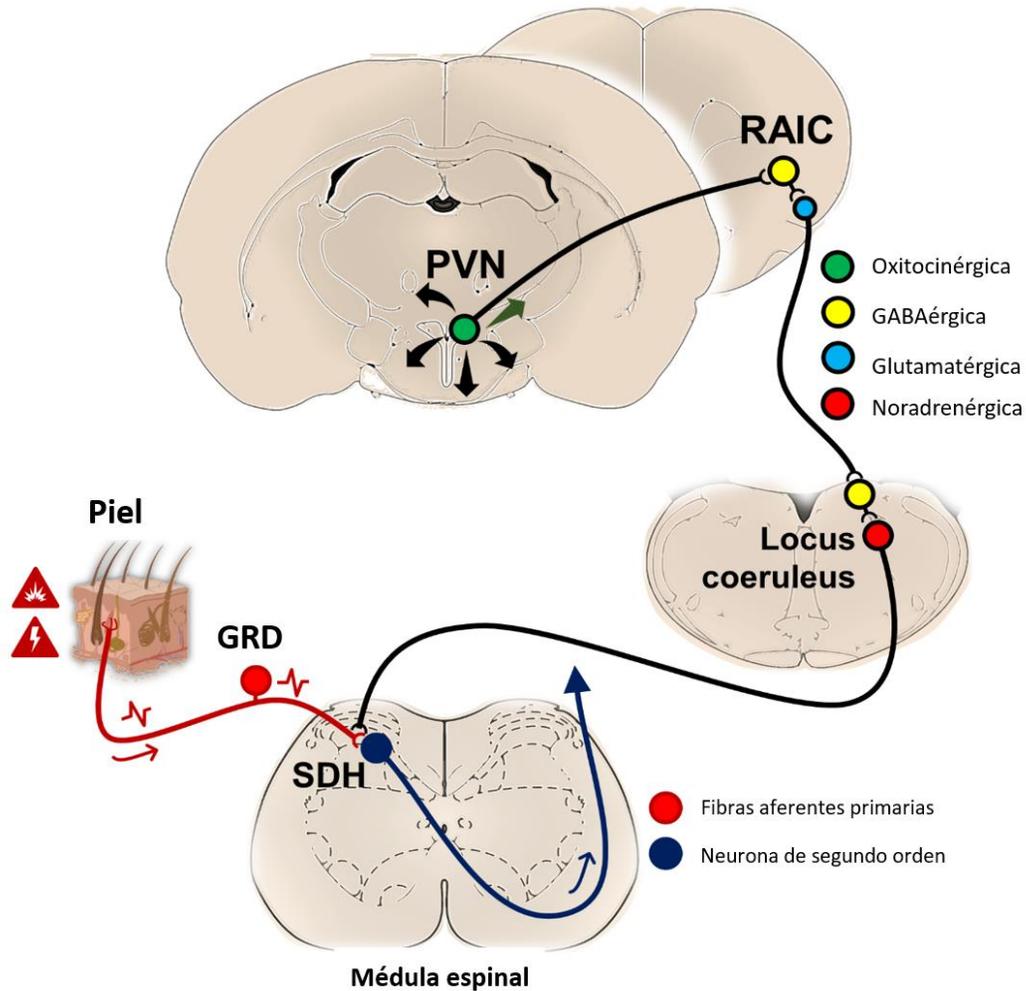


Figura 9. Un resumen de los principales hallazgos del presente estudio. Desde la RAIC, proyecciones glutamatérgica se dirigen a células GABAérgicas en la región peri-LC que inhiben tónicamente las neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus (LC) en la nocicepción inflamatoria (Jasmin et al.,2003). Aquí, mostramos que las proyecciones oxitocinérgicas provenientes del PVN destinan neuronas GABAérgicas dentro de la RAIC, reclutando una actividad GABAérgica local; de forma específica, a través de la activación del OTR probablemente localizado en neuronas GABAérgicas activando al receptor GABA_A, que inhibe la actividad glutamatérgica de la RAIC hacia la región peri-LC, lo que promueve la desinhibición de LC. Como resultado, se desencadena un mecanismo inhibitor noradrenérgico descendente a nivel del asta dorsal espinal que induce antinocicepción conductual y electrofisiológica.

En este sentido, las neuronas del PVN tienen capacidad de sintetizar y secretar una variedad de péptidos que participan en diferentes funciones incluyendo la modulación de la nocicepción (Gamal-Eltrabily *et al.*, 2018; Kelly y Goodson, 2014; Lee *et al.*, 2013). En el presente trabajo, los experimentos de inmunofluorescencia muestran que solo el 29% de las neuronas de proyección del PVN a la RAIC son OT positivas (Figura 3G), esto sugiere la presencia de otros neuromediadores (no explorados en la presente tesis) involucrados en dicha conexión. De ahí, la participación de otros neurotransmisores/neuromoduladores en la conexión PVN-RAIC no puede ser excluida, así como tampoco la importancia de esta conexión en otros aspectos fisiológicos en los que están relacionadas ambas estructuras (*e.g.* control autonómico) (Lee *et al.*, 2013; Nieuwenhuys, 2012).

8.2. El efecto antinociceptivo de la oxitocina (OT) en la RAIC: evidencia sobre el efecto modulador de oxitocina (OT) a nivel cortical en la nocicepción

La OT ha sido relacionada con efectos antinociceptivos a nivel periférico y espinal ante la administración periférica de formalina (González-Hernández *et al.*, 2017; Reeta *et al.*, 2006). A nivel, cortical, la administración de OT en la corteza orbital ventrolateral (VLO) disminuye la alodinia mecánica inducida por la ligadura del nervio ciático (Taati y Tamaddonfard, 2018). En este trabajo observamos que la microinyección de OT en la RAIC disminuye la nocicepción inducida por la administración periférica de formalina (5%) lo cual se puede apreciar tanto en la primera fase (mediada por activación de nociceptores) como en la segunda fase (debido a un proceso inflamatorio periférico) (Figura 4B-4E).

En este sentido, la microinyección de OT fue realizada por medio de micropipetas de vidrio (diámetro de punta ~10 μm) y un volumen considerablemente bajo (40 nl), minimizando el daño al tejido cerebral que se asocia con este tipo de administraciones

(Robinson, 1972). De hecho, de forma típica, como en el caso del análisis del efecto de la morfina y dopamina en la RAIC sobre la nocicepción, las administraciones fueron realizadas por medio de cánulas de acero inoxidable aplicando un volumen mayor (200-400 nl) (Burkey *et al.*, 1996, 1999). Estas condiciones pueden ser asociadas con la formación de gliosis debido a la presencia prolongada de la canulación, así como la difusión del fármaco a diferentes áreas cercanas lo cual puede afectar la especificidad de los resultados obtenidos. En este sentido, nuestro método experimental (sección 6.3.1.) provee un procedimiento de microinyección intracortical asociada con un menor daño tisular (revisar Figura 4E) y capaz de evaluar los efectos inducidos por la administración de un fármaco en un área cortical específica y limitada.

Es importante recalcar que la disminución en el número de sacudidas de pata, ante la administración periférica de formalina en los animales pretratados con OT en la RAIC se debe a un efecto antinociceptivo inducido por la OT y no a una alteración motora. En la evaluación del *rotarod* (ver Figura 4F), la OT en la RAIC mejoró el tiempo de latencia de los animales sobre la rueda en rotación en comparación con los grupos sham y vehículo que fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales (*i.e.* anestesia, cirugía estereotáxica y la introducción de un electrodo en la corteza cerebral).

En la RAIC, Burkey *et al.*, (1996, 1999) describieron que el efecto antinociceptivo inducido por la dopamina y morfina es mediado por un mecanismo descendente, ya que se asocia con un decremento en la actividad neuronal de las neuronas nociceptivas, así como, una disminución de la expresión de *c-fos* (un índice no específico de la actividad neuronal) en el asta dorsal de la médula espinal. En los experimentos aquí descritos (Figuras. 5 y 6) analizamos el efecto de la administración de OT en la RAIC sobre la actividad neuronal, inducida por formalina al 1%, de las neuronas WDR espinales, a nivel lumbar.

En este contexto, las neuronas registradas demostraron una respuesta neuronal ante diferentes estímulos periféricos como el golpeteo, la presión, la estimulación eléctrica periférica (mostrando una respuesta mediada por fibras A β , A δ y C) y finalmente ante la administración subcutánea de formalina (Figura 5). Por dicha caracterización, podemos mencionar que estas neuronas fueron WDR, ya que se pudo observar una respuesta neuronal ante diferentes modalidades de estímulos periféricos.

En relación con este punto, las neuronas registradas demostraron un aumento en la respuesta neuronal “espontánea” ante la administración periférica de formalina (1%). Dicha respuesta fue bifásica, y concuerda con reportes previos donde se ha descrito una respuesta similar de las neuronas WDR espinales ante la administración de formalina como estímulo nocivo periférico (Diaz y Dickenson, 1997; Dickenson y Sullivan, 1987).

Finalmente, la actividad neuronal “espontánea” se presenta de manera similar a la respuesta observada en los experimentos conductuales donde se cuantifica el número de sacudidas de pata. En este sentido, la microinyección de OT en la RAIC disminuyó la frecuencia de actividad neuronal significativamente en la primera fase de la respuesta y abolió dicha actividad en la segunda fase (Figura 6A-6D). Cabe mencionar que la respuesta neuronal evocada por la estimulación eléctrica del campo receptivo somático se conservó a lo largo del curso temoral (Figura 6E), sugiriendo que el efecto observado es debido a un efecto específico de la OT en la RAIC y no se debe a una pérdida de la actividad neuronal o un “registro perdido”. En su conjunto, estos datos sugieren que el efecto antinociceptivo de la OT en la RAIC es mediado por un mecanismo descendente que modula la entrada de la información relacionada a nocicepción a nivel espinal.

8.3. La oxitocina (OT) promueve la actividad GABAérgica en la RAIC y un efecto noradrenérgico descendente: evidencias y otros posibles mecanismos

Los efectos ansiolíticos y neuroprotectores inducidos por la OT a nivel del sistema nervioso central parecen ser mediados por la activación del OTR lo cual induce una modulación GABAérgica donde se ve involucrada la actividad de los receptores GABA_A (Kaneko *et al.*, 2016; Sabihi *et al.*, 2017; Thakur *et al.*, 2019). En la nocicepción, la antinocicepción inducida por la OT a nivel periférico y espinal es mediada por OTR, así como la posible participación de interneuronas GABAérgicas (Breton *et al.*, 2008; Condés-Lara *et al.*, 2009; De Los Monteros-Zúñiga *et al.*, 2020; González-Hernández *et al.*, 2017). En este sentido, el aumento de los niveles de GABA en la RAIC produce antinocicepción (Jasmin *et al.*, 2003). Aquí, los estudios conductuales (Figura 7B) sugieren que el efecto antinociceptivo inducido por la OT en la RAIC es mediado por la activación de OTR y los receptores GABA_A a nivel cortical.

Inicialmente, la microinyección de L-368,899 (un antagonista específico de OTR; Williams *et al.*, 1994) en la RAIC previo a la administración de OT abolió su efecto antinociceptivo (Figura 7B-7D). La corteza insular ha sido descrita como un área de expresión de OTR en el cerebro de las ratas adultas (Gimpl y Fahrenholz, 2001); también, las neuronas oxitocinérgicas del PVN hacia las áreas del prosencéfalo se caracterizan con una liberación de OT a través de botones sinápticos pasantes, *passant boutons*, presentes en sus axones (Chini *et al.*, 2017). Nuestros resultados confirman la expresión de OTR en la RAIC, así como la relación entre algunas células corticales que expresan OTR con las fibras provenientes del PVN (Figura 8A), de ahí esos datos refuerzan la hipótesis acerca del papel del OTR en la antinocicepción inducida por OT a nivel de la RAIC.

Por otra parte, el aumento de los niveles de GABA en la RAIC ha sido asociado con un efecto antinociceptivo (Jasmin *et al.*, 2003) demostrando la importancia de los

mecanismos GABAérgicos locales en la modulación de la nocicepción. En este contexto, las proyecciones dopaminérgicas del área ventral tegmental (VTA) destinan neuronas GABAérgicas en la RAIC sugiriendo su participación en el efecto antinociceptivo inducido por la dopamina en la RAIC (Ohara *et al.*, 2005). Aquí, de manera similar, mostramos que las proyecciones del PVN destinan neuronas GABAérgicas en la RAIC (Figura 8B-8C), probablemente células GABAérgicas que expresan OTR (Figura 8D-8E), apoyando la noción de la presencia de una actividad GABAérgica inducida por la OT en la RAIC.

Jasmin *et al.*, (2003) describieron que la activación de los receptores GABA_A en la RAIC induce una desinhibición del LC y promueve un mecanismo noradrenérgico descendente generando antinocicepción. En primer lugar, aquí demostramos que la administración de bicuculina (un antagonista de los receptores GABA_A) en la RAIC, inhibe la antinocicepción inducida por la OT (Figura 7B-7D). Este resultado, en conjunto con los resultados obtenidos de los estudios de inmunofluorescencia anteriormente mencionados, indican que la OT en la RAIC promueve un mecanismo GABAérgico local que incluye la activación de los receptores GABA_A para inducir antinocicepción. En efecto, se ha demostrado que la OT aumenta los niveles locales de GABA en la corteza prefrontal (Qi *et al.*, 2012).

En segundo lugar, la administración intratecal de BRL 44408 (un antagonista de los receptores α_{2A} -adrenérgicos), inhibió parcialmente el efecto antinociceptivo inducido por la administración intracortical de OT (solamente en la fase 2 de la prueba de la formalina). Estos datos sugieren que la OT a nivel de la RAIC promueve el reclutamiento de mecanismos noradrenérgicos que a su vez promueven una modulación descendente de la nocicepción. Sin embargo, el efecto modesto del BRL 44408 sugiere que este mecanismo descendente no es crucial en el efecto intracortical inducido por la OT.

En este contexto, la RAIC tiene conexiones con diferentes áreas corticales, *e.g.* ACC y la corteza prefrontal, así como, estructuras subcorticales tal como la AMG (Jasmin *et al.*, 2004) y Chen *et al.*, (2010) describieron la posible participación del sistema de RAIC-PAG-RVM en la modulación de la nocicepción; razón por la cual la presencia de interacciones cortico-corticales o cortico-subcorticales pueden también estar jugando un papel relevante en el efecto de la OT (Jung *et al.*, 2016; Ohara *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2009). En resumen, la participación de otros sistemas descendentes moduladores debe ser considerada, ya que, el efecto antinociceptivo inducido por la OT en la RAIC no fue completamente inhibido por la administración intratecal de BRL 44408.

Finalmente, tanto la administración *per se* de bicuculina o BRL 44408, no mostró ningún efecto significativo sobre la nocicepción inducida por la formalina lo cual concuerda con los datos reportados por Jasmin *et al.*, (2003). Sin embargo, la microinyección de L-368,899 en la RAIC fue asociada con un aumento en el número de sacudidas de pata inducidas por la formalina, es decir, produjo un efecto pronociceptivo (Figura 7E-7G). En este aspecto, la actividad de las neuronas oxitocinérgicas en el PVN se ve incrementada ante la administración periférica de formalina, así como por la ligadura parcial del nervio ciático (Motojima *et al.*, 2017; Nishimura *et al.*, 2019), lo que sugiere la presencia de una modulación oxitocinérgica endógena de la nocicepción bajo dichas condiciones. Nuestros resultados sugieren la presencia de una liberación tónica de la OT en la RAIC ante la presencia de un estímulo nocivo inflamatorio.

En resumen, los datos obtenidos en la presente tesis demuestran que neuronas oxitocinérgicas del PVN proyectan hacia la RAIC donde destinan neuronas GABAérgicas que expresan OTR, ahí la OT puede generar un efecto antinociceptivo por medio la activación

de OTR lo cual promueve una actividad GABAérgica cortical (mediado por los receptores GABA_A) desinhibiendo al LC y generando un efecto noradrenérgico descendente inhibitor.

8.4. Perspectivas del Proyecto

A partir de los datos antes discutidos, estos hallazgos abren paso para nuevas preguntas de investigación que pueden ser de interés para entender la modulación de la nocicepción a nivel de la corteza cerebral.

Primero, la participación de otros péptidos liberados por el PVN hacía la RAIC, así como aspectos funcionales de la conexión PVN-RAIC en la modulación de la información nociva. Segundo, los mecanismos involucrados en el efecto modulador de la OT en la RAIC en presencia de un estímulo nocivo inflamatorio que pueden incluir: (i) la participación de otros sistemas moduladores descendentes (*e.g.* serotoninérgico, opioidérgico, dopaminérgico); (ii) la modulación oxitocinérgica sobre la conexión RAIC-AMG; y (iii) la existencia de interacciones cortico-corticales que modulan el procesamiento de la información nociva. Tercero, el posible efecto antinociceptivo de la OT en la RAIC en presencia de dolor neuropático y sus posibles mecanismos. Finalmente, el PVN puede modular la nocicepción a nivel periférico, espinal y supraespinal lo cual propone este núcleo como un posible orquestador del sistema endógeno de la modulación de nocicepción. En este contexto, aquí demostramos evidencia que el PVN puede modular la información nociceptiva a nivel de la RAIC, futuros estudios sobre la presencia de una modulación oxitocinérgica sobre otras áreas corticales involucradas en la nocicepción serán importantes para describir la magnitud e importancia de este circuito de modulación de nocicepción a nivel supraespinal.

9. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran la presencia de una vía neural directa entre el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y la corteza insular agranular rostral (RAIC). Por otra parte, en la RAIC se observó la expresión del OTR, en específico, sobre neuronas GABAérgicas y además, se demostró una relación entre las fibras provenientes del PVN y neuronas GABAérgicas las cuales expresan OTR. En este sentido, la microinyección de OT en la RAIC produce un efecto antinociceptivo en un modelo de dolor inflamatorio.

En los estudios electrofisiológicos, la microinyección de OT en la RAIC disminuye la actividad espontánea de las neuronas WDR espinales ante la inyección de formalina en su campo receptivo, estos datos sugieren que el efecto antinociceptivo de la OT en la RAIC es mediado por un efecto descendente inhibitor.

La antinocicepción conductual inducida por la OT fue abolida con el bloqueo del receptor a OT y los receptores GABA_A en la RAIC y parcialmente con el bloqueo de los receptores α_{2A} -adrenérgicos a nivel espinal. Estos datos sugieren que la OT en la RAIC produce un efecto antinociceptivo mediado por un mecanismo GABAérgico en la RAIC lo cual desinhibe al LC y desencadena un mecanismo descendente noradrenérgico en presencia de un estímulo nocivo. Bajo las mismas condiciones, la administración de L368-899 en la RAIC produjo un efecto pronociceptivo sugiriendo una liberación tónica de la OT en la RAIC ante la presencia de un estímulo nocivo tónico.

Referencias

- Bale, T. L., Davis, A. M., Auger, A. P., Dorsa, D. M. & McCarthy, M. M. (2001). CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *Journal of Neuroscience*, 21: 2546–2552.
- Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1978). Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Annals of Neurology*, 4: 451-462.
- Berthier, M., Starkstein, S., & Leiguarda, R. (1988). Asymbolia for pain: A sensory-limbic disconnection syndrome. *Annals of Neurology*, 24: 41-49.
- Boccia, M. L., Petrusz, P., Suzuki, K., Marson, L., & Pedersen, C. A. (2013). Immunohistochemical localization of oxytocin receptors in human brain. *Neuroscience* 253: 155-164.
- Breton, J. D., Veinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A. M., Freund-Mercier, M. J., Schlichter, R., & Poisbeau, P. (2008). Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Molecular Pain*, 4: 1744-8069.
- Burkey, A. R., Carstens, E., & Jasmin, L. (1999). Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. *Journal of Neuroscience*, 19: 4169-4179.
- Burkey, A. R., Carstens, E., Wenniger, J. J., Tang, J., & Jasmin, L. (1996). An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *Journal of Neuroscience*, 16: 6612-6623.
- Chen, Y. L., Li, A. H., Yeh, T. H., Chou, A. H., Weng, Y. S., & Wang, H. L. (2010). Nocistatin excites rostral agranular insular cortex-periaqueductal gray projection

neurons by enhancing transient receptor potential cation conductance via G α q/11-PLC-protein kinase C pathway. *Neuroscience*, 168: 226-239.

Chini, B., Verhage, M., & Grinevich, V. (2017). The action radius of oxytocin release in the mammalian CNS: from single vesicles to behavior. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38: 982-991.

Coffeen, U., López-Avila, A., Ortega-Legaspi, J. M., Del Ángel, R., López-Muñoz, F. J., & Pellicer, F. (2008). Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *European Journal of Pain*, 12: 535-543.

Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J. M., López-Muñoz, F. J., Simón-Arceol, K., Jaimes, O., & Pellicer, F. (2011). Insular cortex lesion diminishes neuropathic and inflammatory pain-like behaviours. *European Journal of Pain*, 15: 132-138.

Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., & Rojas-Piloni, G. (2008). Paraventricular hypothalamic nucleus stimulation modulates nociceptive responses in dorsal horn wide dynamic range neurons. *Neuroscience Letters*, 444: 199-202.

Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rojas-Piloni, G., & Rodríguez-Jiménez, J. (2007). Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Research*, 1160: 20-29.

Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rubio-Beltrán, E., Rodríguez-Jiménez, J., Rojas-Piloni, G., & González-Hernández, A. (2015). Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation enhances c-Fos expression in spinal and supraspinal structures related to pain modulation. *Neuroscience Research*, 98: 59-63.

Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., & Rodríguez-Jiménez, J. (2009). Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious

stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *European Journal of Neuroscience*, 30: 1056-1063.

Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Diez-Martínez, D. C., & Rodríguez-Jiménez, J. (2012). Functional interactions between the paraventricular hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *Neuroscience*, 209: 196-207.

Condés-Lara, M., Zayas-González, H., Manzano-García, A., Córdova-Quiroz, E., Granados-Mortera, J., García-Cuevas, M., Morales-Gómez, J. & González-Hernández, A. (2016). Successful pain management with epidural oxytocin. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 22: 532.

DeLaTorre, S., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Villanueva, L., & Condés-Lara, M. (2009). Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: electrophysiological and behavioral evidence. *PAIN*, 144: 320-328.

Diaz, A., & Dickenson, A. H. (1997). Blockade of spinal N-and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin inflammation. *PAIN*, 69: 93-100.

Dickenson, A. H., & Sullivan, A. F. (1987). Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *PAIN*, 30: 349-360.

Dubuisson, D., & Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *PAIN*, 4: 161-174.

- Eliava, M., Melchior, M., Knobloch-Bollmann, H. S., Wahis, J., da Silva Gouveia, M., Tang, Y., Ciobanu, A. C., Triana del Rio, R., Roth, L. C., Althammer, F., Chavant, V., Goumon, Y., Gruber, T., Petit-Demouliere, N., Busnelli, M., Chini, B., Tan, L. L., Mitre, M., Froemke, R. C., Chao, M. V., Giese, G., Sprengel, R., Kuner, R., Poisbeau, P., Seeburg, P. H., Stoop, R., Charlet, A., & Chavant, V. (2016). A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron*, 89: 1291-1304.
- Fox, S. I., (2014). *Fisiología humana*, CDMX, México, McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Gamal-Eltrabily, M., & Manzano-García, A. (2018). Role of central oxytocin and dopamine systems in nociception and their possible interactions: suggested hypotheses. *Reviews in the Neurosciences*, 29: 377-386.
- Gamal-Eltrabily, M., Márquez-Morales, C., Martínez-Lorenzana, G., González-Hernández, A., & Condés-Lara, M. (2018). Peptidergic nature of nociception-related projections from the hypothalamic paraventricular nucleus to the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience letters*, 685: 124-130.
- Gamal-Eltrabily, M., Martínez-Lorenzana, G., González-Hernández, A. & Condés-Lara, M. (2021). Cortical modulation of nociception. *Neuroscience*, 458: 256-270
- Gao, L. & Yu, L.C. (2004). Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats. *Regulatory Peptides*, 120: 53–58.
- Ge, Y., Lundeberg, T., & Yu, L. C. (2002). Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Research*, 927: 204–207.

- Gebhart, G. F. (2004). Descending modulation of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27: 729-737.
- Gilbert, A. K., & Franklin, K. B. (2001). GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *PAIN*, 90: 25-36.
- Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81: 629-683.
- Gregory, N. S., Harris, A. L., Robinson, C. R., Dougherty, P. M., Fuchs, P. N., & Sluka, K. A. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The Journal of Pain*, 14: 1255-1269.
- Godínez-Chaparro, B., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Manzano-García, A., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. (2016). The potential role of serotonergic mechanisms in the spinal oxytocin-induced antinociception. *Neuropeptides*, 60: 51-60.
- Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11: 1-5.
- González-Hernández, A., De Los Monteros-Zuñiga, A. E., Martínez-Lorenzana, G., & Condés-Lara, M. (2019). Recurrent antinociception induced by intrathecal or peripheral oxytocin in a neuropathic pain rat model. *Experimental Brain Research*, 237: 2995-3010.
- González-Hernández, A., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Tello-García, I. A., Carranza, M., Arámburo, C., & Condés-Lara, M. (2017). Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons. *PAIN*, 158: 2117-2128.

- Gu, X. L. & Yu, L. C. (2007). Involvement of opioid receptors in oxytocin-induced antinociception in the nucleus accumbens of rats. *The Journal of Pain*, 8: 85-90.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C., (2008). *Guyton y Hall Compendio de fisiología médica*, Barcelona, España, Elsevier.
- Heinricher, M. M., & Ingram, S. L. (2008). The Brainstem and Nociceptive Modulation. In *PAIN*, 5: 593-626.
- Han, Y. & Yu, L. C. (2009). Involvement of oxytocin and its receptor in nociceptive modulation in the central nucleus of amygdala of rats. *Neuroscience Letter*, 454: 101–104.
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*, 60: 214-225.
- Jasmin, L., Granato, A., & Ohara, P. T. (2004). Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: A tract-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 468: 425-440.
- Jasmin, L., Rabkin, S. D., Granato, A., Boudah, A., & Ohara, P. T. (2003). Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature*, 42: 316-320.
- Jung, H. H., Shin, J., Kim, J., Ahn, S. H., Lee, S. E., Koh, C. S., Cho J. S., Kong, C., Shin H. C., Kim S. J., & Chang, J. W. (2016). Rostral Agranular Insular Cortex Lesion with Motor Cortex Stimulation Enhances Pain Modulation Effect on Neuropathic Pain Model. *Neural Plasticity* 2016: 3898924.

- Kaneko, Y., Pappas, C., Tajiri, N., & Borlongan, C. V. (2016). Oxytocin modulates GABA_AR subunits to confer neuroprotection in stroke in vitro. *Scientific Reports*, 6: 35659.
- Kelly, A. M., & Goodson, J. L. (2014). Hypothalamic oxytocin and vasopressin neurons exert sex-specific effects on pair bonding, gregariousness, and aggression in finches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 6069-6074.
- Knobloch, H. S., Charlet, A., Hoffmann, L. C., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A. H., Schwarz, M. K., Seeburg, P. H., Stoop, R. & Grinevich, V. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron*, 73: 553-566.
- Lee, S. K., Ryu, P. D., & Lee, S. Y. (2013). Differential distributions of neuropeptides in hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Neuroscience Letters*, 556: 160-165.
- Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP basic pain Terminology. *PAIN*, 137: 473-477.
- Lu, C., Yang, T., Zhao, H., Zhang, M., Meng, F., Fu, H., Xie, Y., & Xu, H. (2016). Insular cortex is critical for the perception, modulation, and chronification of pain. *Neuroscience Bulletin*, 32: 191-201.
- Lundeberg, T., Uvnäs-Moberg, K., Agren, G., & Bruzelius, G. (1994). Anti-nociceptive effects of oxytocin in rats and mice. *Neuroscience Letter*, 170: 153–157.
- Mack, S. O., Kc, P., Wu, M., Coleman, B. R., Tolentino-Silva, F. P., & Haxhiu, M. A. (2002). Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *Journal of Applied Physiology*, 92: 826–834.

- Mestre, C., Péliissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., & Eschalier, A. (1994). A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 32: 197-200.
- Moaddab, M., Hyland, B. I., & Brown, C. H. (2015). Oxytocin excites nucleus accumbens shell neurons in vivo. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 68: 323-330.
- Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 283-294.
- Morgan, M. M., Sohn, J. H., & Liebeskind, J. C. (1989). Stimulation of the periaqueductal gray matter inhibits nociception at the supraspinal as well as spinal level. *Brain Research*, 502: 61-66.
- Motojima, Y., Matsuura, T., Yoshimura, M., Hashimoto, H., Saito, R., Ueno, H., Marayuma, S., Sonoda, S., Suzuki H., Kawasaki, M., Ohnishi, H., Sakai, A., & Ueta, Y. (2017). Comparison of the induction of c-fos-eGFP and Fos protein in the rat spinal cord and hypothalamus resulting from subcutaneous capsaicin or formalin injection. *Neuroscience*, 356: 64-77.
- Nahin, R. L. (2015). Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. *The Journal of Pain*, 16: 769-780.
- Nieuwenhuys, R. (2012). The insular cortex: a review. *Progress in Brain Research*, 195: 123-163.
- Nishimura, H., Kawasaki, M., Suzuki, H., Matsuura, T., Motojima, Y., Ohnishi, H., Yamanka, Y., Yoshimura, M., Marayuma, T., Saito, R., Ueno, H., Sonoda, S., Nishimura, K., Onaka, T., Ueta, Y., & Sakai, A. (2019). Neuropathic pain up-regulates hypothalamo-neurohypophysial and hypothalamo-spinal oxytocinergic pathways in

- oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rat. *Neuroscience*, 406: 50-61.
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B. R., Tillet, Y., & Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of Neurocytology*, 32: 131-141.
- Ohara, P. T., Vit, J. P., & Jasmin, L. (2005). Cortical modulation of pain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 44-52.
- Peters, S., Slattery, D. A., Uschold-Schmidt, N., Reber, S. O., & Neumann, I. D. (2014). Dose-dependent effects of chronic central infusion of oxytocin on anxiety, oxytocin receptor binding and stress-related parameters in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 42, 225-236.
- Paxinos, G., & Watson, C., (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*, London, United Kingdom, Academic Press.
- Pittman, Q. J., Blume, H. W., & Renaud, L. P. (1981). Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res*, 215: 15-28.
- Quintero, G. C. (2013). Advances in cortical modulation of pain. *Journal of Pain Research*, 6: 713-725.
- Rash, J. A., Aguirre-Camacho, A., & Campbell, T. S. (2014). Oxytocin and pain: a systematic review and synthesis of findings. *The Clinical journal of Pain*, 30: 453-462.
- Reeta, K. H., Mediratta, P. K., Rathi, N., Jain, H., Chugh, C., & Sharma, K. K. (2006). Role of κ -and δ -opioid receptors in the antinociceptive effect of oxytocin in formalin-induced pain response in mice. *Regulatory peptides*, 135: 85-90.

- Robinson, N. (1972). Enzyme response of traumatized tissue after intracortical injection into 5 day old rat brain. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 35: 865-872.
- Rojas-Piloni, G., López-Hidalgo, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., & Condés-Lara, M. (2007). GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Research*, 1137: 69-77.
- Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., DelaTorre, S., & Condés-Lara, M. (2008). Nociceptive spinothalamic tract and postsynaptic dorsal column neurons are modulated by paraventricular hypothalamic activation. *European Journal of Neuroscience*, 28: 546-558.
- Rojas-Piloni, G., Mejía-Rodríguez, R., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara M. (2010). Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neuroscience Letters*, 476: 32-35.
- Rojas-Piloni, G., Rodríguez-Jiménez, J., Martínez-Lorenzana, G., & Condés-Lara, M. (2012). Dorsal horn antinociception mediated by the paraventricular hypothalamic nucleus and locus coeruleus: A comparative study. *Brain Research*, 1461: 41-50.
- Sabihi, S., Dong, S. M., Maurer, S. D., Post, C., & Leuner, B. (2017). Oxytocin in the medial prefrontal cortex attenuates anxiety: anatomical and receptor specificity and mechanism of action. *Neuropharmacology*, 125: 1-12.
- Schmahmann, J. D., & Leifer, D. (1992). Parietal pseudothalamic pain syndrome: clinical features and anatomic correlates. *Archives of Neurology*, 49: 1032-1037.
- Taati, M., & Tamaddonfard, E. (2018). Ventrolateral orbital cortex oxytocin attenuates neuropathic pain through periaqueductal gray opioid receptor. *Pharmacological Reports*, 70: 577-583.

- Thakur, P., Shrivastava, R., & Shrivastava, V. K. (2019). Effects of exogenous oxytocin and atosiban antagonist on GABA in different region of brain. *IBRO Reports*, 6: 185-189.
- Tsuruoka, M., & Willis, W. D. (1996). Descending modulation from the region of the locus coeruleus on nociceptive sensitivity in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Brain Research*, 743: 86-92.
- van den Burg, E. H., & Hegoburu, C. (2020). Modulation of expression of fear by oxytocin signaling in the central amygdala: From reduction of fear to regulation of defensive behavior style. *Neuropharmacology*, 108130.
- van den pol A. (1982). the Magnocellular and Parvocellular Paraventricular Nucleus of Rat: Intrinsic Organization. *Journal of Comparative Neurology* 206: 317-345.
- Wang, J. W., Lundeberg, T., & Yu, L. C. (2003). Antinociceptive role of oxytocin in the nucleus raphe magnus of rats, an involvement of mu-opioid receptor. *Regulatory Peptides*, 115: 153-159.
- Wheeler-Aceto, H., & Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*, 104: 35-44.
- Williams, P. D., Anderson, P. S., Ball, R. G., Bock, M. G., Carroll, L., Chiu, S. H. L., Clinschmidt B. V., Culberson, C., Erb, J. M., Evans, B. E., Fitzpatrick, S. L., Freindinger, R. M., Kaufman M. J., Lundel, G. F., Murphy, J. S., Pawluczyk, J. M., Perlow, D. S., Pettibone, D. J., Pitzenberger, S. M., Thompson, K. L., Verber, F. V. (1994). 1-(((7, 7-Dimethyl-2 (S)-(2 (S)-amino-4-(methylsulfonyl) butyramido) bicyclo [2.2. 1] heptan-1 (S)-yl) methyl) sulfonyl)-4-(2-methylphenyl) piperazine (L-368,899): an orally bioavailable, non-peptide oxytocin antagonist with potential utility for managing preterm labor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 565-571.

- Wu, W. Y., Liu, C. Y., Tsai, M. L., & Yen, C. T. (2016). Nocifensive behavior-related laser heat-evoked component in the rostral agranular insular cortex revealed using morphine analgesia. *Physiology & Behavior*, 154: 129-134.
- Xie, Y. F., Huo, F. Q., & Tang, J. S. (2009). Cerebral cortex modulation of pain. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30: 31-41.
- Yang, J., Chen, J. M., Yang, Y., Liu, W. Y., Song, C. Y., & Lin, B. C. (2008). Investigating the role of hypothalamic paraventricular nucleus in nociception of the rat. *International Journal of Neuroscience*, 118: 473-485.
- Yang, J. W., Shih, H. C., & Shyu, B. C. (2006). Intracortical circuits in rat anterior cingulate cortex are activated by nociceptive inputs mediated by medial thalamus. *Journal of Neurophysiology*, 96: 3409-3422.
- Yang, J., Yang, Y., Chen, J. M., Liu, W. Y., Wang, C. H., & Lin, B. C. (2007). Central oxytocin enhances antinociception in the rat. *Peptides*, 28: 1113-1119.
- Yirmiya, R., Ben-Eliyahu, S., Shavit, Y., Marek, P., & Liebeskind, J. C. (1990). Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Research*, 537: 169-174.
- You, H. J., Lei, J., Niu, N., Yang, L., Fan, X. L., Tjølsen, A., & Li, Q. (2013). Specific thalamic nuclei function as novel ‘nociceptive discriminators’ in the endogenous control of nociception in rats. *Neuroscience*, 232, 53-63.
- Yu, S. Q., Lundeberg, T., & Yu, L. C. (2003). Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Research*, 983: 13-22.
- Zayas-González, H., González-Hernández, A., Manzano-García, A., Hernández-Rivero, D., García-Cuevas, M. A., Granados-Mortera, J. C., Vaca-Aguirre, L., Flores-Fierro, S., Martínez-Lorenzana, G., & Condés-Lara, M. (2019). Effect of local infiltration with

- oxytocin on hemodynamic response to surgical incision and postoperative pain in patients having open laparoscopic surgery under general anesthesia. *European Journal of Pain*, 23: 1519-1526.
- Zhang, C. E., Yang, S. W., Guo, Y. G., Qiao, J. T., & Dafny, N. (1997). Locus coeruleus stimulation modulates the nociceptive response in parafascicular neurons: an analysis of descending and ascending pathways. *Brain Research Bulletin*, 42: 273-278.
- Zhou, X. J., Yang, J., Yan, F. L., Wang, D. X., Li, X. Y., Fan, X. Q., Hao, F., Yan, X. Q., Li, X. P., Li, H., Liu, W. Y., & Lin, B. C. (2010). Norepinephrine plays an important role in antinociceptive modulation of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *International Journal of Neuroscience*, 120: 428-438.
- Zhuo, M., & Gebhart, G. F. (1997). Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 78: 746-758.

Apéndice

Publicaciones

Artículo derivado de esta tesis fue publicado en la revista *The Journal of Neuroscience*.

- i. **Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. (2020). The rostral agranular insular cortex, a new site of oxytocin to induce antinociception. *The Journal of Neuroscience*, 40: 5669-5680. [IF=5.67]

Artículo de revisión relacionada al tema de tesis fue publicado en la revista *Neuroscience*.

- ii. **Gamal-Eltrabily, M.**, Martínez-Lorenzana, G., González-Hernández, A. & Condés-Lara, M. (2021). Cortical modulation of nociception. *Neuroscience*, 458: 256-270. [IF=3.06]

Resumen derivado de esta tesis publicado en la revista *Journal of Neurochemistry*.

- iii. **Gamal-Eltrabily, M.**, Espinosa de los Monteros-Zúñiga, A., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández A. (2019) PVN projections to the rostral agranular insular cortex and the posible role in nociception. *Journal of Neurochemistry*, 150(S1):165. [IF=4.87]

Otras publicaciones durante mi formación en el programa de doctorado:

- iv. Martínez-Lorenzana, G., **Gamal-Eltrabily, M.**, Tello-García, I. A., Martínez-Torres, A., Becerra-González, M., González-Hernández, A., & Condés-Lara, M. (2020). CLARITY with neuronal tracing and immunofluorescence to study the somatosensory system in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 109048.

- v. **Gamal-Eltrabily, M.**, & Manzano-García, A. (2018). Role of central oxytocin and dopamine systems in nociception and their possible interactions: suggested hypotheses. *Reviews in the Neurosciences*, 29: 377-386.
- vi. **Gamal-Eltrabily, M.**, Márquez-Morales, C., Martínez-Lorenzana, G., González-Hernández, A., & Condés-Lara, M. (2018). Peptidergic nature of nociception-related projections from the hypothalamic paraventricular nucleus to the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience Letters*, 685: 124-130.
- vii. Manzano-García, A., & **Gamal-Eltrabily, M.** (2017). A new role of growth hormone and insulin growth factor receptor type 1 in neonatal inflammatory nociception. *Pain Reports*, 2: e608.

Participación en congresos

Durante el desarrollo de la presente tesis, los resultados experimentales fueron presentados en diferentes congresos nacionales e internacionales.

- i. **Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. PVN oxytocinergic projections to rostral agranular insular cortex: a possible role in nociception modulation. *Montreal Conference on Pain circuits*. 03 de agosto del 2019, Montreal, Canadá.
- ii. **Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. PVN oxytocinergic projections to rostral agranular insular cortex: a possible role in nociception modulation. *ISN-ASN meeting*. 06 de agosto del 2019, Montreal, Canadá.
- iii. **Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. Proyecciones oxitocinérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo a la corteza insular y su

función en la nocicepción. LXII Congreso nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (SMCF), 13 de agosto del 2019, Querétaro, México.

- iv. Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. PVN oxytocinergic projections to rostral agranular insular cortex: a possible role in nociception modulation. Las jornadas académicas del Instituto de Neurobiología (INb), 15 de agosto del 2019, Querétaro, México.
- v. Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. The study of neuronal connection between the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) and rostral agranular insular cortex (RAIC): a posible role in nociception. Las jornadas académicas del INb, 19 de septiembre del 2018, Querétaro, México.
- vi. Gamal-Eltrabily, M.**, de Los Monteros-Zúñiga, A. E., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. Neuronal connection between the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) and rostral agranular insular cortex (RAIC): a posible role in nociception. Las jornadas académicas del INb, 22 de septiembre del 2017, Querétaro, México.

Reconocimientos

- i.** Tercer lugar en el concurso de mejor presentación oral, Las jornadas académicas del Instituto de Neurobiología (INb). 15 de agosto del 2019, Querétaro, México.
- ii.** Travel award en *ISN-ASN meeting*. 06 de agosto del 2019, Montreal, Canadá.
- iii.** Travel award en *IASP world congress on pain*. 04 de agosto del 2020, Ámsterdam. Países Bajos. (congreso pospuesto a junio 2021 en modalidad virtual debido a la pandemia de COVID-19).