



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA OXITOCINA SOBRE LA TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA EN EL
COMPLEJO TRIGÉMINO CERVICAL DE LA RATA: PAPEL DE LOS
RECEPTORES DE OXITOCINA Y VASOPRESINA 1A**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:
JOSÉ ENRIQUE GARCÍA BOLL
MÉDICO CIRUJANO**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. ABIMAEI GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. GERARDO ROJAS PILONI
DR. SIDDHARTHA MONDRAGÓN RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

JURIQUILLA QUERÉTARO, JUNIO 2018



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: José Enrique García Boll, cuyo título es: **“Efecto de la oxitocina sobre la transmisión nociceptiva en el complejo trigeminocervical de la rata: papel de los receptores de oxitocina y vasopresina 1A.”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y de calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente:

Dr. José Fernando Peña Ortega

Secretario:

Dr. Abimael González Hernández

Vocal:

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez

Suplente:

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Suplente:

Dr. Víctor Hugo de Lafuente Flores

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

Coordinadora del Programa

RESUMEN

El complejo trigeminocervical (TCC, por sus siglas en inglés) juega un papel fundamental en la modulación de aferencias nociceptivas provenientes de estructuras craneofaciales. Algunos reportes sugieren que la oxitocina (OXT) puede estar involucrada en la modulación de las aferencias nociceptivas a nivel del TCC, sin embargo, hasta el momento ningún estudio ha probado esta hipótesis. Utilizando un abordaje electrofisiológico y farmacológico, el presente estudio analizó el efecto de la OXT en la señalización nociceptiva a nivel del TCC e identificó el receptor involucrado.

En ratas anestesiadas con sevoflurano, se realizaron registros unitarios extracelulares de neuronas de segundo orden a nivel del TCC las cuales respondían a estímulos nocivos provocados en la primera rama del nervio trigémino (V1; oftálmica). Bajo estas condiciones experimentales, se realizaron curvas dosis respuesta analizando el efecto de la administración local de OXT (0.2, 2 y 20 nmol / 20 μ l; a nivel del TCC) sobre las respuestas neuronales nociceptivas provocadas por la estimulación eléctrica de la rama oftálmica del trigémino. Además, se realizaron experimentos para determinar el receptor involucrado en los efectos de la OXT a través del bloqueo farmacológico del receptor a OXT (OTR) con L-368,899 y del receptor a vasopresina V_{1A} ($V_{1A}R$) con SR-49059.

La actividad neuronal nociceptiva en el TCC provocada por estimulación eléctrica del nervio oftálmico fue inhibida por la administración local (en el TCC) de OXT. Dicho efecto fue observado como una disminución del disparo neuronal asociado a la actividad de las fibras $A\delta$ y C. Dado que esta antinocicepción era abolida al pretratar (administración local en el TCC) con un antagonista selectivo al receptor de OXT (OTR; L-368,899), y permanecía sin alteraciones con un antagonista selectivo al receptor de vasopresina 1A ($V_{1A}R$; SR-49059), dicha antinocicepción fue asociada a la activación del OTR.

Este estudio demuestra que la OXT inhibe la actividad nociceptiva en el TCC a través de la activación del OTR, por lo que el OTR podría representar un nuevo blanco farmacológico para tratar padecimientos que involucren la activación de aferencias nociceptivas a nivel del TCC.

SUMMARY

The Trigemino-cervical Complex (TCC) plays a key role modulating the nociceptive input arriving from craniofacial structures. Some reports suggest that oxytocin (OXT) could play a role modulating the nociceptive input at the TCC level, but no study has properly tested this hypothesis. Using an electrophysiological and pharmacological approach, the present study aimed to determine the effect of OXT on the nociceptive signaling in the TCC and the receptor involved.

In sevoflurane, anesthetized rats, we performed electrophysiological unitary recordings of second order neurons at the TCC region responding to peripheral nociceptive evoked responses of the first branch (V1; ophthalmic) of the trigeminal nerve. Under this condition, we constructed dose-response curves analyzing the effect of local spinal OXT (0.2, 2 and 20 nmol/20 μ l; at TCC) on TCC nociceptive neuronal firing. Furthermore, we tested the role of OXT receptors (OTR; L-368,899) or vasopressin 1A receptors ($V_{1A}R$; SR-49059) involved in the OXT effects.

OXT dose-dependently inhibits the peripheral-evoked activity in nociceptive TCC neurotransmission. This inhibition is associated with a blockade of neuronal activity of A δ and C-fibers. Since this antinociception was abolished by pretreatment (in the TCC) with a potent and selective OTR antagonist (L-368,899) and remained unaffected after the $V_{1A}R$ antagonist (SR-49059), the role of OTR is implied.

This electrophysiological study demonstrates that OXT inhibits the peripheral-evoked neuronal activity at TCC, through OTR activation. Thus, OTR may represent a new potential drug target to treat craniofacial nociceptive dysfunction in the TCC.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme con mi sustento económico. CVU/Becario: 770703/612278

Al programa de apoyo a los estudios de posgrado por contribuir económicamente en mi formación.

A los miembros de mi comité por la orientación y tutela que me brindaron.

Al Dr. Abimael González Hernández por sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Miguel Condés Lara por recibirme en su laboratorio y por sus enseñanzas.

A la Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana por su colaboración con la histología y captura de imágenes.

A los demás integrantes del laboratorio B16 de dolor y epilepsia por las sugerencias, comentarios y el apoyo que me dieron.

A mi familia Andrea García Boll, Iris Boll y José Arcadio García, por su cariño y el apoyo que me han dado para superarme en todo momento.

A mis tíos Alicia Cruz y Luis Boll por su hospitalidad.

El presente proyecto fue realizado en el Instituto de Neurobiología en el Laboratorio B-16 de Dolor y Epilepsia a cargo del Dr. Miguel Condés Lara y fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través de los proyectos número IA203117 (Dr. Abimael González Hernández) e IN200415 (Dr. Miguel Condés Lara).

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina, por sus siglas en inglés
GABA	Ácido γ -amino butírico, por sus siglas en inglés
OXT	Oxitocina
OTR	Receptor a oxitocina
PAG	Sustancia gris periacueductal, por sus siglas en inglés
PVN	Núcleo Paraventricular del Hipotálamo, por sus siglas en inglés
EEM	Error estándar de la media
Sp5c	Subnúcleo <i>caudalis</i>
Sp5i	Subnúcleo <i>intermedialis</i>
Sp5o	Subnúcleo <i>oralis</i>
SNK	Student-Newman-Keuls
TCC	Complejo Trigémico Cervical, por sus siglas en inglés
V _{1A} R	Receptor V _{1A} de vasopresina
V1	Rama oftálmica del trigémino
V2	Rama maxilar del trigémino
V3	Rama mandibular del trigémino
VPM	Tálamo ventro postero medial
WDRn	Neuronas de amplio rango dinámico, por sus siglas en inglés

ÍNDICE

Resumen	iii
Summary	iv
Abreviaturas	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Anatomía del sistema nociceptivo trigeminal	3
2.1.1. Generalidades	3
2.1.2. Fibras aferentes primarias	5
2.1.3. El Complejo Trigemino-cervical (TCC)	6
2.1.4. Proyecciones ascendentes del TCC	7
2.2. Modulación de la vía nociceptiva trigeminal	8
2.2.1. Modulación de la nocicepción trigeminal en tronco encefálico	9
2.2.2. Modulación hipotalámica de la nocicepción trigeminal	10
2.2.2.1. Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)	11
2.3. Oxitocina (OXT)	12
2.3.1. Generalidades	12
2.3.2. Evidencia de la OXT como neuromediador antinociceptivo	12
2.3.3. Modulación oxitocinérgica de la nocicepción a nivel espinal	13
2.3.3.1. Mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo de la OXT	14
2.3.3.2. Receptores involucrados en el efecto antinociceptivo de la OXT	14
2.4. Modelo electrofisiológico en la nocicepción trigeminal	16
3. UBICACIÓN DEL PROYECTO	18
3.1. Justificación	18
3.2. Hipótesis	19
3.3. Objetivos	19
3.3.1. Objetivo general	19
3.3.2. Objetivos específicos	19

4. MATERIALES Y MÉTODOS	<u>20</u>
4.1. Animales	<u>20</u>
4.2. Procedimiento general	<u>20</u>
4.2.1. <i>Procedimiento quirúrgico</i>	<u>20</u>
4.2.2. <i>Registros electrofisiológicos extracelulares unitarios in vivo en el complejo trigeminocervical (TCC)</i>	<u>21</u>
4.2.3. <i>Análisis histológico de los sitios de registro</i>	<u>22</u>
4.3. Fármacos	<u>22</u>
4.4. Presentación de datos y análisis estadístico	<u>23</u>
5. RESULTADOS	<u>24</u>
5.1. General	<u>24</u>
5.2. Estabilidad de los registros electrofisiológicos	<u>24</u>
5.3. La administración espinal de OXT inhibe la actividad nociceptiva evocada periféricamente en neuronas de segundo orden WDRn en el TCC	<u>24</u>
5.4. El antagonista del OTR y no el del V _{1A} R bloquea la antinocicepción inducida por OXT en el TCC	<u>28</u>
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	<u>31</u>
6.1. General	<u>31</u>
6.2 La oxitocina bloquea las aferencias nociceptivas en neuronas del TCC a través del OTR	<u>31</u>
6.3 Otras evidencias apoyando el papel del OTR a nivel del TCC	<u>34</u>
6.4 Consideraciones finales e implicaciones clínicas	<u>35</u>
6.5. Conclusiones	<u>36</u>
7. REFERENCIAS	<u>37</u>
8. ÍNDICE DE FIGURAS	<u>49</u>
9. APÉNDICE	<u>50</u>
9.1. Participación en congresos	<u>50</u>
9.2. Publicación	<u>50</u>

1. INTRODUCCIÓN

Una de las funciones vitales del sistema nervioso es la de proveer información sobre la ocurrencia o amenaza de daño tisular a través de lo que hemos denominado dolor. Aun cuando se considera que el dolor no es un sentido primario como la visión, la somatosensación o la audición, el dolor es un proceso complejo evocado en primera instancia por la presencia de un estímulo aversivo o nociceptivo. Esta capacidad de detectar estímulos nocivos es esencial para la supervivencia de los organismos.

Desde esta perspectiva, el dolor ha sido definido como una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño real o potencial de un tejido (IASP; *International Association for the Study of Pain*). Esta definición implica un componente sensorial y un componente perceptual. El componente sensorial (nocicepción) está asociado primariamente a la detección (por un nociceptor) y transmisión del estímulo nociceptivo hacia el sistema nervioso central, mientras que el componente perceptual involucra diversos procesos relacionados con la cognición.

En este sentido, los trastornos de dolor craneofacial representan un gran desafío. Cualitativamente, la forma en que se procesa el dolor a nivel craneofacial es un tanto diferente que en el resto del organismo (Chichorro et al., 2017). De hecho, se ha demostrado que la aplicación repetitiva de estímulos nociceptivos que en la región craneofacial induce sensibilización, en otras regiones el mismo estímulo repetitivo induce habituación (Schmidt et al., 2015). La región craneofacial abarca diversas estructuras como la piel facial, meninges, cavidad oral, entre otras. Estos tejidos craneofaciales se encuentran inervados por el nervio trigeminal¹ cuyo soma se encuentra en el ganglio trigeminal (Bereiter et al., 2009). En este sentido, los estímulos nocivos de la región craneofacial son transmitidos hacia el núcleo espinal trigeminal (Sp5)² principalmente por el nervio trigeminal a través de la rama oftálmica.

¹ Anatómicamente, el nervio trigeminal se compone de tres ramas principales, denominadas: (i) rama oftálmica o V1; (ii) rama maxilar o V2; y (iii) rama mandibular o V3.

² El Sp5 es un núcleo sensorial que de acuerdo a su estructura anatómica puede ser subdividido en 3 subnúcleos, el *oralis* (Sp5O), *interpolaris* (Sp5I) y el *caudalis* (Sp5C).

Es importante mencionar que aun cuando la información de la rama V1 arriba principalmente a la región Sp5C, en algunos casos llega también a los segmentos cervicales superiores (C₁-C₃). Esta región Sp5C/C1-C2 conforma una división anatómo-funcional denominada complejo trigeminocervical (TCC) y juega un papel fundamental en la modulación de la nocicepción de estructuras craneofaciales (Bartsch et al., 2005). A este nivel, las aferentes primarias nociceptivas de la rama V1 hacen sinapsis con neuronas de segundo orden las cuales proyectan a núcleos supraespinales (Hu, 1990; Shimizu and Suzuki, 2011).

Desde esta perspectiva, se ha demostrado que el TCC al ser un sitio de relevo de la información proveniente de la periferia puede ser modulado de forma endógena por diversos sistemas (Akerman et al., 2011; Goadsby et al., 2009) a través de diversos neuromoduladores como la adrenalina, serotonina, opioides, y posiblemente la oxitocina (OXT) (Ong et al., 2018).

La OXT es un nonapéptido sintetizado principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Du Vigneaud et al., 1954). Dicho neuropéptido es bien conocido por su papel en la lactancia, trabajo de parto y en la conducta afectiva, sin embargo, en los últimos años se ha estudiado a la OXT como un modulador de la nocicepción a nivel espinal (Miranda-Cardenas et al., 2006; Condés-Lara et al., 2006) sin que hasta el momento se tengan evidencias directas de la participación de este neuropéptido modulando la entrada de información nociceptiva en el TCC.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe una modulación de la nocicepción a nivel del TCC. Para poner a prueba esta hipótesis se realizaron registros extracelulares unitarios de neuronas de segundo orden denominadas neuronas de amplio rango dinámico (WDRn; ver sección 2.1.3.). Bajo este abordaje electrofisiológico no solo se analizó el efecto de la administración local de OXT (en el TCC) sobre las respuestas nociceptivas evocadas por la estimulación eléctrica de la rama oftálmica sino también el receptor involucrado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Anatomía del sistema nociceptivo trigeminal.

2.1.1. Generalidades

El trigémino o quinto par craneal, es un nervio con funciones mixtas ya que es tanto motor como sensorial (Leston et al., 2009). Las eferencias motoras, inervan principalmente a los músculos de la masticación mientras que las aferencias sensitivas (táctiles y nociceptivas) inervan la región oral, facial y craneal. El trigémino (Figura 1), es llamado así por sus tres divisiones anatómicamente discernibles: i) la rama oftálmica (V1) la cual inerva la córnea, la punta de la nariz, mucosa intranasal, el dorso de la cabeza, párpado superior, área supraorbital y meninges, ii) la rama maxilar (V2) que inerva el área infra y postorbital, labio superior y dientes de la maxila y iii) la rama mandibular (V3) encargada de la inervación de la articulación temporomandibular, labio inferior, mentón, mucosa oral mandibular, parte anterior de la lengua y dientes de la mandíbula (Shankland et al., 2001) (Figura 1).

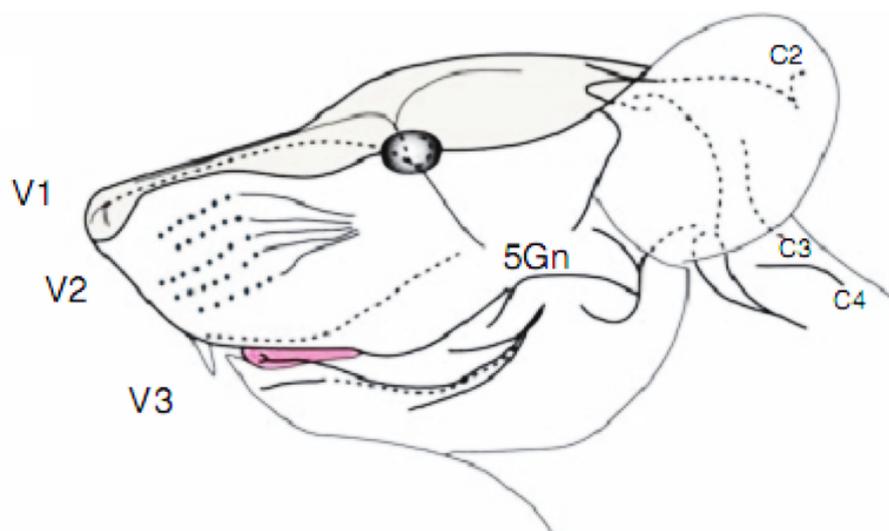


Figura 1. Inervación trigeminal en la rata. El nervio trigémino se divide en tres. La rama oftálmica (V1), la rama maxilar (V2) y la rama mandibular (V3). Cada una de estas ramas inerva diferentes estructuras craneofaciales. El soma neuronal de estas fibras sensitivas se encuentra en el ganglio del trigémino (5Gn), mientras que las terminales nerviosas proyectan a nivel de la región trigeminal caudal y cervical C1, C2 donde hacen sinapsis con neuronas de segundo orden. Con base a su estructura, estas neuronas trigeminales son consideradas pseudounipolares. *Modificado de Cephalalgia (2013), 33(8) 577 592.*

La función principal del sistema nociceptivo trigeminal es alertar al organismo de un daño potencial de la región que inerva. Aunque las aferencias de los nociceptores en la piel son similares a los del resto del cuerpo, los mecanismos trigeminales de nocicepción presentan características específicas que ameritan consideración especial como la córnea, meninges y la pulpa dental, ya que frecuentemente provocan un dolor difícil de localizar o pueden ocurrir incluso en ausencia de una lesión tisular evidente (Wall and Melzack's et al., 2013).

La transmisión de la nocicepción se lleva a cabo por la activación de fibras A δ y fibras C, las primeras son fibras ligeramente mielinizadas y las segundas son fibras amielínicas, la mielina permite que la velocidad de despolarización a lo largo del axón sea mayor por lo que las fibras C tendrán una velocidad menor a las fibras A δ (Fernandes E. et al., 2016) (Figura 2).

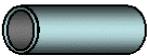
		Umbral térmico
	<p>Fibras Aα y Aβ Mielinizadas Velocidad de conducción: 3-70 y 70-120 m/s respectivamente Diámetro: 12-20 y 5-12 μm respectivamente Propiocepción</p>	No tiene
	<p>Fibras Aδ Ligeramente mielinizadas Velocidad de conducción: 12-30 m/s Menor diámetro: 3-6 μm Nocicepción (estímulos mecánicos, térmicos y químicos)</p>	<p>~ 53° C Tipo I ~ 43° C Tipo II</p>
	<p>Fibras C Ligeramente mielinizadas Velocidad de conducción: < 2 m/s Diámetro: 0.4-1.2 μm Nocicepción (estímulos mecánicos, térmicos y químicos)</p>	<p>~ 43° C Tipo II</p>

Figura 2. Clasificación de las fibras nerviosas aferentes en el ganglio de la raíz dorsal (GRD)³ y en ganglio trigeminal (TG). Hay que considerar que esta clasificación no contempla características moleculares tales como la constitución por proteínas estructurales, marcadores moleculares y neurotransmisores putativos (Lawson & Waddell, 1991; Julius & McCleskey, 2006).

³ Lloyd & Chang (1948) propusieron una clasificación diferente para las fibras nerviosas aferentes del músculo esquelético. Grupos I, II, III y IV. Donde las fibras del grupo I, II, III y IV se sobrelapan en parte con las fibras A α , A β , A δ y C respectivamente.

2.1.2. Fibras aferentes primarias

La rama V1 inerva el área supraorbital, las meninges y vasos sanguíneos intracraneales, principalmente el seno sagital superior y la arteria meníngea media. La activación de las aferentes primarias mediante estímulos mecánicos, químicos o eléctricos resulta en la activación de la vía nociceptiva, la cual si llega a niveles supraespinales se interpretará como dolor (McNaughton FL et al., 1977; Ray BS et al 1940).

Estas proyecciones de fibras aferentes primarias de la rama V1 entran al tronco encefálico/medula espinal por el asta dorsal donde hacen sinapsis con neuronas de segundo orden tanto en el núcleo trigeminal a nivel del Sp5C como a nivel de los segmentos cervicales superiores (el denominado complejo trigeminocervical o TCC) (Akerman et al., 2013) (Figura 3).

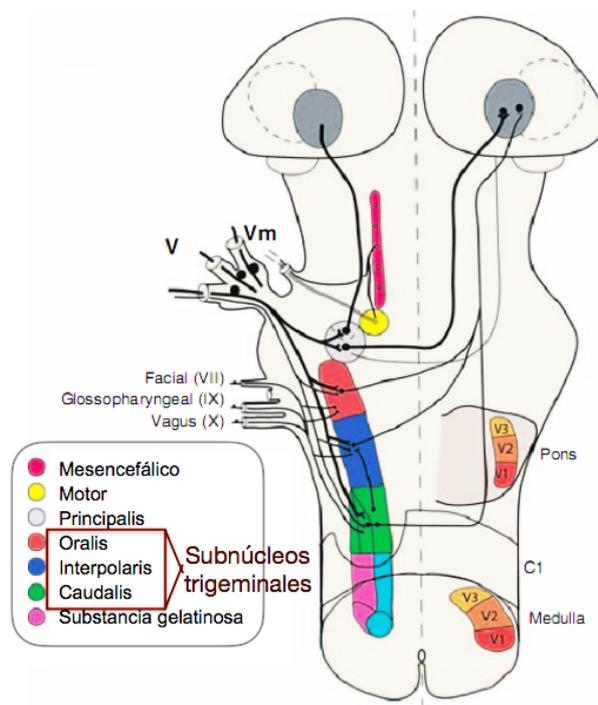


Figura 3. Proyección de aferentes primarias y subnúcleos trigeminales. El núcleo del trigémino se divide en tres subnúcleos, el oralis (Sp5O), interpolaris (Sp5I) y el caudalis (Sp5C). En esta región se distribuyen somatotópicamente las fibras aferentes del trigémino. Sin embargo, se ha demostrado que las aferentes primarias de la rama oftálmica proyectan más allá del subnúcleo caudalis, llegando a zonas medulares de C1 y C2. Estas estructuras en conjunto se conocen como el complejo trigemino cervical (TCC). *Modificado de Cephalalgia (2013), 33(8) 577-592.*

2.1.3. El Complejo Trigemino-cervical

De los tres subnúcleos trigeminales, el Sp5c es el único segmento con una estructura laminar y con una organización morfológica y funcional comparable al de la medula espinal. Las fibras nociceptivas A δ y C predominantemente terminan en láminas superficiales I - II, así como en láminas más profundas, lamina V (Liu et al., 2008; Burstein et al., 1998; Holland et al., 2007).

Específicamente las fibras aferentes primarias de la rama V1 hacen sinapsis en la región Sp5c y en la región medular cervical de C1 y C2. A estas regiones en conjunto se les conoce como el complejo trigemino-cervical (TCC) (Bartsch et al., 2003). El TCC, más que ser una estructura exclusivamente anatómica, se le ha descrito también como una estructura funcional. En padecimientos con dolor craneofacial (e.g. migraña), las aferencias nociceptivas que convergen y se distribuyen a lo largo del TCC pueden generar sensibilización central y presentar hipersensibilidad cutánea en dermatomas trigeminales, principalmente en el área inervada por la rama V1 (Bartsch et al., 2003).

Diferentes estudios electrofisiológicos han demostrado que el TCC contiene neuronas que se activan por: i) aferencias nociceptivas específicas; ii) estímulos nociceptivos e ino-cuos que activan neuronas de amplio rango dinámico o WDRn, las cuales son neuronas convergentes de segundo orden que reciben aferencias de diferentes tipos de fibras como A β , A δ y C (Figura 4) y iii) neuronas que responden específicamente al frío o tacto ligero (Sessle, 2000). En el caso de las WDRn, estas reciben convergencia de aferencias externas (cutaneas) e internas (meninges, músculo, pulpa dental) (Craig, 2003).

En este estudio se realizaron registros extracelulares unitarios de WDRn las cuales respondían a la estimulación táctil y a estímulos nocivos de tipo eléctrico en el campo receptivo periférico.

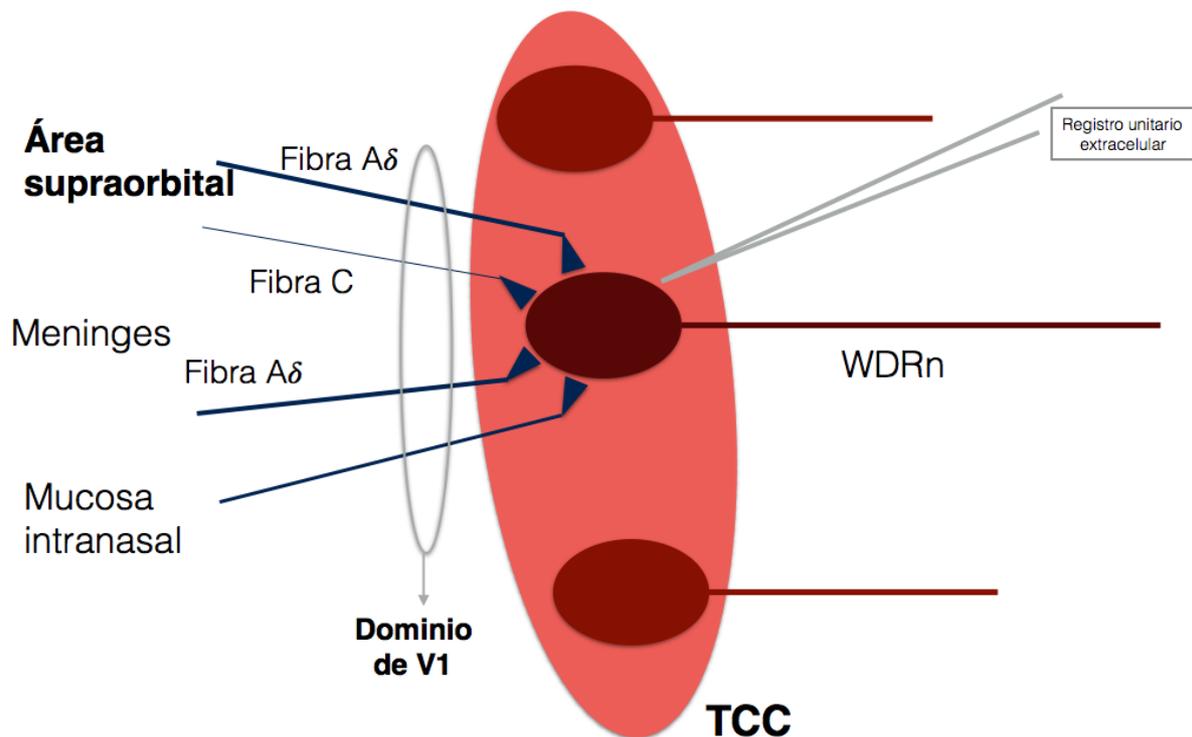


Figura 4. Convergencia de aferentes primarios en el complejo trigémino cervical. Neuronas de amplio rango dinámico (WDRn, por sus siglas en inglés) donde convergen aferencias de la rama oftálmica (V1) tanto fibras A δ como C. Estas WDRn son las que se registraron para analizar la actividad neuronal provocada mediante estimulación eléctrica en el área supraorbital. Ver apartado “4.2.2. Registros electrofisiológicos extracelulares unitarios in vivo”.

2.1.4. Proyecciones ascendentes del TCC

Toda la información nociceptiva proveniente de estructuras craneofaciales hace relevo en el TCC y asciende a otras áreas del tronco encefálico, núcleos supraespinales y corteza encefálica para así procesar e integrar la percepción del dolor. Mediante diversos estudios con el uso de trazadores y fisiología funcional se han logrado mapear y describir la trayectoria de estas conexiones ascendentes (Noseda et al., 2013).

Entre otras conexiones ascendentes podemos mencionar a la medula rostro-ventro medial, el núcleo del rafe magno, núcleo parabraquial y el locus *coeruleus* (Robert et al., 2013); en el mesencefalo a la sustancia gris periacueductal (PAG) y el núcleo cuneiforme (Liu et al., 2009), todos con aferencias nociceptivas funcionales

procedentes de la región V1 ([Hoskin et al., 1999](#); [Hoskin et al., 2001](#); [Burstein et al., 1998](#)).

La información somatosensorial y visceral nociceptiva proveniente de la cabeza y de estructuras orofaciales, vía el TCC, proyectan a diferentes zonas del hipotálamo a lo largo del tracto trigémino-hipotalámico, incluyendo los núcleos anterior, lateral, posterior, ventromedial, paraventricular, perifornical y supraóptico del hipotálamo ([Burstein et al., 1987](#); [Mallick et al., 1998](#); [Mallick et al., 2000](#)).

De forma similar las aferencias nociceptivas de la región V1, hacen relevo en el TCC, viajan por el tracto trigémino-talámico hacia el tálamo ([Liu et al., 2009](#); [Veinante et al., 2000](#)) y principalmente son procesadas en el tálamo ventroposteromedial (VPM). De hecho, el tálamo es considerado el centro de procesamiento e integración de información nociceptiva. El tálamo junto con la corteza somatosensorial, cíngula anterior y prefrontal son los encargados de integrar las respuestas sensoriales, afectivas y cognitivas del dolor ([Tracey 2008](#)) ([Figura 5](#)).

Además, existen otras dos estructuras involucradas en este complejo procesamiento de la nocicepción, la amígdala y el hipocampo, las cuales son cruciales para la integración afectiva y cognitiva del dolor ya que presentan plasticidad estructural relacionada con la activación de la vía nociceptiva trigeminal y la evolución clínica de estos padecimientos ([Liu et al., 2017](#)).

2.2. Modulación de la vía nociceptiva trigeminal

Las proyecciones ascendentes del TCC son las encargadas del procesamiento de la información nociceptiva craneofacial que viaja a sitios supraespinales y corticales, sin embargo, existen diversos mecanismos endógenos descendentes que modulan estas aferencias nociceptivas trigeminales las cuales determinan la forma en que se perciben. Por ejemplo, estudios de imagen por tomografía de emisión de positrones analizaron la actividad en áreas del tronco encefálico y diencefalo, antes, durante y después de un ataque migrañoso, al presentar alivio del dolor disminuía la actividad, sugiriendo que estas áreas son centros moduladores de la percepción del dolor

(Weiller et al., 1995; Bahra et al., 2001). Estudios preclínicos (Akerman et al., 2011; Goadsby et al., 2009) han demostrado que diversas señales descendentes de núcleos específicos pueden facilitar o inhibir el procesamiento nociceptivo del sistema trigeminal (Figura 6).

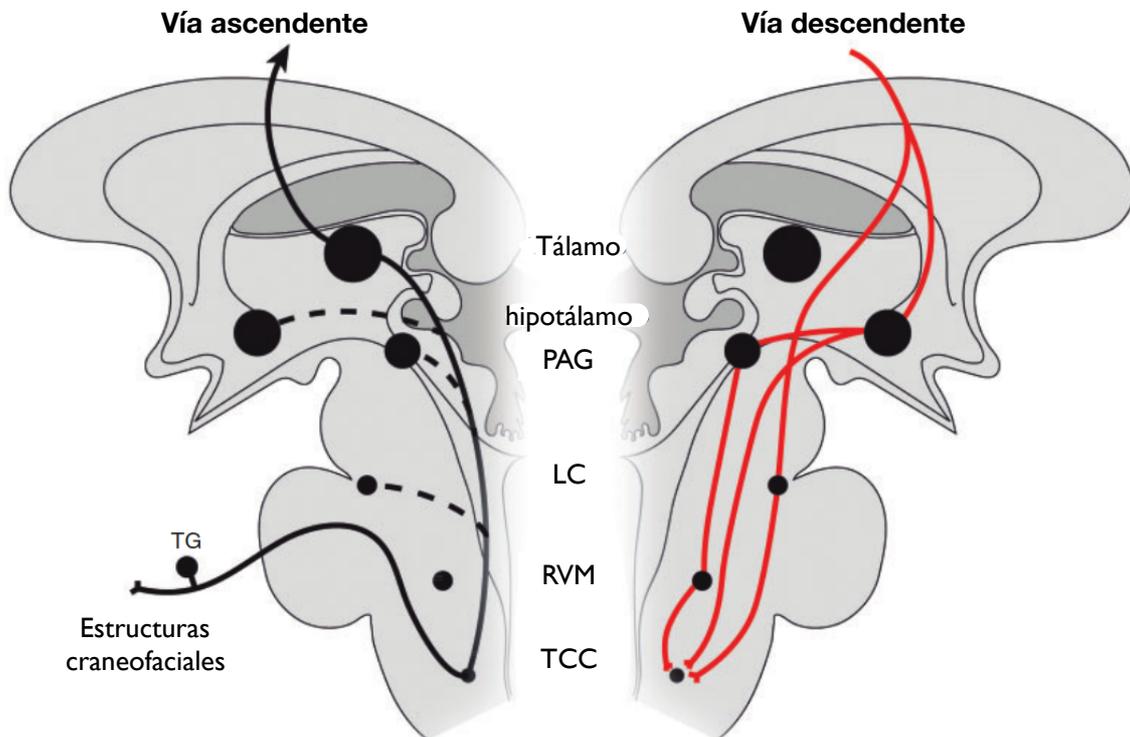


Figura 5. Proyecciones ascendentes y descendentes de la vía trigeminal. Las aferencias primarias del trigémino hacen sinapsis con neuronas de segundo orden en el TCC. Estas neuronas de segundo orden ascienden por el tracto espinotalámico haciendo sinapsis con neuronas tálamo-corticales de tercer orden. Sin embargo, existen otras proyecciones ascendentes directas e indirectas a diferentes sitios del tronco encefálico y diencefalo como el locus *coeruleus* (LC), sustancia gris periacueductal (PAG) y el hipotálamo. EL TCC es regulado por vías moduladoras descendentes, por proyecciones directas e indirectas del hipotálamo, médula rostro-ventro medial (RVM), PAG y LC. Esta compleja red regula la información nociceptiva proveniente del TCC. *Cephalalgia* (2018), 0(0) 1 - 13.

2.2.1. Modulación de la nocicepción trigeminal en tronco encefálico

Dentro del tronco encefálico las estructuras capaces de modular la nocicepción en la vía trigeminal se encuentran: (i) el núcleo salivatorio superior, (ii) el locus *coeruleus*, sitio principal de síntesis de norepinefrina (Amaral et al., 1977), (iii) la médula rostro-ventro medial la cual es un cluster de neuronas las cuales reciben proyecciones

bidireccionales de la sustancia gris periacueductal (PAG) y del asta dorsal espinal (Basbaum et al., 1978; Fields et al., 1985), (iv) el núcleo del rafe magno, el cual envía proyecciones serotoninérgicas al TCC en ratas y gatos (Lovick et al., 1983) y (v) la PAG, estructura mesencefálica que envía proyecciones directas a la medula espinal e indirectamente a la medula rostro-ventro medial la cual contribuye a la modulación descendente del dolor (Weiller et al., 1995).

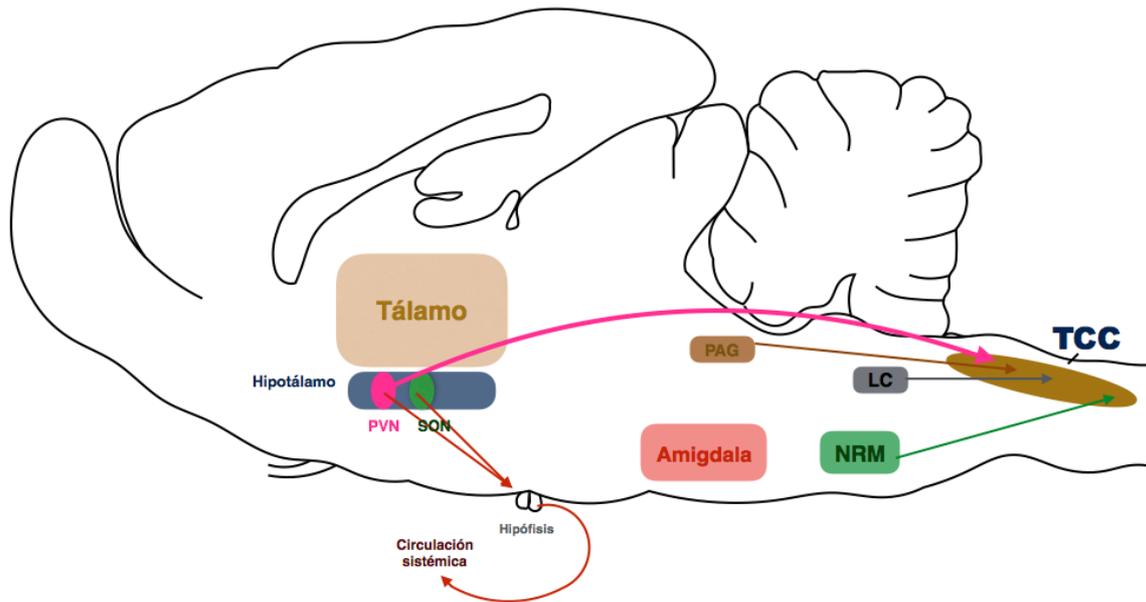


Figura 6. Modulación descendente de la vía nociceptiva trigeminal. Diferentes estructuras funcionan como moduladores endógenos de analgesia mediante proyecciones descendentes al TCC, entre ellas podemos mencionar al hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, locus *coeruleus*, núcleo del rafe magno, entre otras.

Además, el tronco encefálico interactúa con diversos núcleos hipotalámicos que son capaces de modular el dolor en el procesamiento de la vía trigeminal, así como el apetito, el despertar, entre otros circuitos neuronales (Holland et al., 2018).

2.2.2. Modulación hipotalámica de la nocicepción trigeminal

En particular, el hipotálamo está involucrado en diferentes funciones fisiológicas incluyendo el control de los ciclos sueño-vigilia, regulando el hambre, la sed, el despertar, la diuresis, así como la regulación de funciones autonómicas y endocrinas (Panda et al., 2004; Settle, 2000). En el caso de la modulación

nociceptiva craneofacial, en particular en el caso de la migraña, se ha sugerido que el hipotálamo participa activamente en su fisiopatología (Goder et al., 2001; Dalkvist et al., 1984). Esto nos sugiere que si el hipotálamo está implicado en el origen de padecimientos que involucran la activación de la vía nociceptiva trigeminal este pudiera estar regulando a su vez la entrada de información nociceptiva a nivel del TCC.

De hecho se sabe que el hipotálamo (en particular el núcleo paraventricular, PVN) tiene conexiones directas con el Sp5C (Abdallah et al., 2013; Robert et al., 2013; Malick et al., 1998). Ciertamente, el hipotálamo está relacionado con estructuras involucradas en la modulación descendente del dolor como lo son el núcleo del tracto solitario, la médula rostro-ventro medial, la sustancia gris periacueductal (PAG) y el núcleo del rafe magno (Settle, 2000) y se ha sugerido que proyecciones descendentes hipotalámicas provenientes del núcleo posterior hipotalámico y el núcleo A11 modulan el procesamiento nociceptivo trigeminal (Akerman et al., 2005). En este sentido, los principales neuromediadores involucrados han sido las orexinas, el péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), serotonina y dopamina (Robert et al., 2013; Bartsch et al., 2004, Charbit et al., 2009).

2.2.2.1. Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)

En el caso del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) se ha demostrado que esta estructura es capaz de modular la nocicepción a nivel espinal, particularmente a niveles lumbares. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la estimulación eléctrica del PVN disminuye la actividad de fibras nociceptivas a nivel lumbar (Miranda-Cardenas et al., 2006). Resultados similares han sido obtenidos en experimentos conductuales, en ratas con ligadura de nervio ciático, donde se observó una disminución en su alodinia al estimular el PVN (Condes-Lara et al., 2006). De hecho se ha demostrado que existe una vía descendente del PVN a médula espinal (Condes-Lara et al., 2007). En los ejemplos antes mencionados se sugiere que el neuromediador involucrado ha sido la oxitocina (OXT), ya que al administrar este neuropéptido de forma exógena a nivel espinal se observaron efectos similares a la estimulación del PVN (Condes-Lara et al., 2006).

Particularmente, dentro del PVN existen dos poblaciones neuronales oxitocinérgicas, las magnocelulares y las parvocelulares. Las magnocelulares proyectan a la hipófisis posterior o neurohipófisis donde la OXT puede ser liberada al torrente sanguíneo y las parvocelulares que proyectan a las WDRn de la medula espinal (Eliava et al., 2016).

En el caso del TCC, en particular del Sp5C se sabe que el PVN modula la nocicepción a este nivel, pero se desconoce el neuromediador involucrado. Considerando los antecedentes antes mencionados, la OXT pudiera modular la nocicepción a nivel del TCC.

2.3. Oxitocina

2.3.1. Generalidades

La oxitocina es un neuropéptido de nueve aminoácidos (cisteína - tirosina - isoleucina - glutamina - aspargina - cisteína - prolina - leucina - glicina), que como vimos anteriormente se sintetiza principalmente en el PVN pero también en el núcleo supraóptico y núcleo accesorio del hipotálamo.

La palabra oxitocina significa nacimiento rápido (del griego “oxys” rápido y “tokos” nacimiento) ya que la primera función conocida fue en el trabajo de parto, donde se liberan grandes cantidades tras la distensión del cervix uterino lo que favorece las contracciones uterinas para así inducir y facilitar el trabajo de parto. También es fundamental para la eyección de leche materna en respuesta a la estimulación del pezón. Dentro del sistema nervioso central se le ha involucrado en el reconocimiento y establecimiento de relaciones sociales, patrones sexuales y la conducta parental.

2.3.2. Evidencia de la oxitocina como neuromediador antinociceptivo

Fisiológicamente, diversos estudios sugieren una relación entre el dolor y la oxitocina. Por ejemplo, se ha observado que durante el embarazo, donde los niveles plasmáticos de OXT aumentan (Kuwabara et al., 1987), la frecuencia de ataques

migrañosos disminuyen en pacientes previamente diagnosticados (Hoshiyama et al., 2012). En este sentido, comparando a mujeres migrañosas que alimentaron a sus bebés con fórmula láctea contra mujeres migrañosas que dieron lactancia materna, estas últimas presentaban niveles circulantes de OXT más altos (Grewen et al., 2010) y presentaron una recurrencia menor en la frecuencia de ataques migrañosos (Hoshiyama et al., 2012). Además, hombres y mujeres presentan elevación de los niveles plasmáticos de OXT durante el coito y orgasmo (Carmichael et al., 1987), y 47% de las mujeres reportan que el coito generó un alivio en la migraña (Evans et al., 2001). Philips y colaboradores observaron que la OXT administrada IV en el postparto inmediato en mujeres con migraña para inducir la contracción uterina, había una mejoría en su dolor (secundario al parto) al término de la infusión (Philips et al., 2006). En conjunto estas observaciones sugieren que la OXT puede ser un nuevo tratamiento farmacológico para el manejo del dolor.

La OXT puede ejercer sus efectos antinociceptivos a nivel espinal (Breton et al., 2008; Rojas-Piloni et al., 2010; Jiang et al., 2014), periférico (Qiu, 2014) y supraespinal (Russo et al., 2012). El efecto antinociceptivo de la OXT se ha documentado en diferentes estudios sin embargo, no se conoce con precisión cual es el mecanismo de acción por el cual la OXT es capaz de reducir la transmisión del dolor.

2.3.3. Modulación oxitocinérgica de la nocicepción a nivel espinal

En un modelo crónico de ligadura de nervio ciático, se estimuló eléctricamente al PVN y se observó que produce efectos antinociceptivos a nivel espinal, mismos que fueron abolidos al administrar intratecalmente un antagonista del OTR, de forma similar al administrar OXT intratecal a nivel lumbar se observó un efecto antinociceptivo (Miranda-Cardenas et al., 2006; Condes-Lara et al., 2006; DeLaTorre et al., 2009). Específicamente experimentos electrofisiológicos a nivel de la médula espinal lumbar, han demostrado que la OXT es capaz de bloquear la actividad de fibras nociceptivas A δ y C, sin afectar las fibras A β (no nociceptivas) (Rojas-Piloni et al., 2007; Hobo et al., 2012). Sumado a esto se han descrito neuronas oxitocinérgicas del PVN que proyectan a las láminas profundas y superficiales de la

medula espinal (Condes-Lara et al., 2007; Saper et al., 1976; Rousselot et al., 1990). Estos resultados sugieren la participación de la OXT en la nocicepción espinal.

2.3.3.1. Mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo de la OXT

A nivel espinal se han sugerido diferentes mecanismos mediante el cual la activación del OTR pueden estar ejerciendo su efecto antinociceptivo. En un modelo *in vitro*, usando neuronas de fibras aferentes primarias nociceptivas, se indujo una despolarización con KCl y se observó que la OXT producía una inhibición de la despolarización al hiperpolarizar la membrana regulando el flujo de Ca^{2+} (Hobo et al., 2012) por la activación de la vía nNOS/NO-K_{ATP} (Gong et al., 2015), un mecanismo asociado a la antinocicepción (Brito et al., 2006).

Otro mecanismo propuesto sugiere que el efecto antinociceptivo de la OXT esta mediado por interneuronas GABAérgicas (Breton et al., 2008; Rojas-Piloni et al., 2007) las cuales inhiben la actividad de las aferentes primarias; esto es, en registros electrofisiológicos unitarios *in vivo* se observó que el efecto antinociceptivo de la OXT en la actividad de fibras A δ y C era bloqueado al administrar bicuculina (antagonista de receptores GABA). De un modo similar, se administró naloxona o un antagonista del receptor μ -opioide (β -funaltrexamina) lo cual indujo un bloqueo parcial del efecto antinociceptivo de la OXT lo que sugiere la participación opioidérgica (Condes-Lara et al., 2009).

2.3.3.2. Receptores involucrados en el efecto antinociceptivo de la OXT

Hasta el momento, los estudios sugieren que la OXT tiene antinociceptivos a nivel espinal, sin embargo existe controversia acerca del receptor involucrado. Fisiológicamente la OXT ejerce su efecto neuroendócrino y neuromodulador al unirse a su receptor, el OTR (Gimpl y Fahrenholz, 2001) pero no se descarta que también pueda estar interactuando con el receptor a vasopresina V_{1A} (V_{1AR}) (Alexander et al., 2015). En este sentido, tanto el OTR como el V_{1AR} son receptores acoplados a proteínas G (GRCP), principalmente G_q, las cuales activan la fosfolipasa C β (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Como hemos visto la OXT tiene un efecto antinociceptivo y por lo tanto un potencial uso terapéutico, sin embargo, no se ha determinado con certeza cual es el receptor involucrado, ya que la OXT tiene afinidad por el OTR y el V_{1A}R. En neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), la inhibición intracelular de corrientes de Ca²⁺ inducida por OXT fue bloqueado por un antagonista selectivo del OTR pero no por un antagonista selectivo del V_{1A}R, sugiriendo el papel de los receptores de OXT (Hobo et al., 2012). En contraste, en otro estudio se demostró que la OXT inhibe la actividad de los ASICs (*acid-sensing ion channels*) en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y este efecto era bloqueado por el SR-49059 (un antagonista selectivo de V_{1A}R) apoyando el papel de los V_{1A}R (Qiu et al. 2014).

A nivel espinal, en ratas se ha demostrado que la administración espinal de OXT y no la vasopresina, es capaz de disminuir selectivamente la actividad nociceptiva neuronal de fibras A δ y C (Rojas-Piloni et al., 2010) y dado que dicho efecto antinociceptivo es bloqueado con un antagonista contra el OTR, el papel de este receptor es sugerido (Rojas-Piloni et al., 2007).

De forma similar, algunos estudios favorecen el papel de los OTRs (Hobo et al., 2012) mientras que otros favorecen a los V_{1A}R (Qiu et al., 2014; Schorscher-Petcu et al., 2010). Usando registros unitarios extracelulares de WDRn Juif y Poisbeau (2013) demostraron en ratas anestesiadas que una concentración plasmática fisiológica de OXT reduce la actividad de fibras C, mientras que una dosis supramáxima de OXT (5 μ g IV) o vasopresina (50ng IV) aumenta la descarga de fibras C, sugiriendo, en esta instancia un efecto inespecífico. El efecto antinociceptivo de la OXT fue bloqueado por el antagonista del OTR y el efecto pronociceptivo de OXT y vasopresina por el antagonista del receptor V_{1A}R. Estos resultados en conjunto apoyan no solo al papel del OTR en la analgesia inducida por OXT sino también el papel pronociceptivo de los receptores periféricos de V_{1A}R. (Juif et al., 2013). Hasta este punto es importante tener en cuenta que a dosis bajas la OXT es incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que en estos casos se hace referencia únicamente a mecanismos periféricos.

En ratones carentes de $V_{1A}R$, no se observó el efecto antinociceptivo (Schorscher-Petcu et al., 2010), por lo que los autores sugirieron que la antinocicepción inducida por OXT es mediada por $V_{1A}R$. Sin embargo, es importante considerar que, aunque los ratones *Knockout* $V_{1A}R$ apoyan el papel de los $V_{1A}R$, las limitaciones potenciales en el uso de ratones transgénicos no deben ignorarse (como la presencia de mecanismos de compensación que se ajustan a la ausencia de los receptores suprimidos). En estos casos se debería considerar un abordaje farmacológico para validar el papel que juega cada uno de los receptores en este efecto antinociceptivo). Dicho esto, aun no se puede determinar cuál receptor es el implicado, y orientar la investigación para definir el papel que juegan estos receptores en la nocicepción resulta de gran interés ya que la OXT se postula como nuevo blanco terapéutico en el manejo del dolor (González-Hernández et al., 2014).

2.4. Modelo electrofisiológico en la nocicepción trigeminal

Como se mencionó anteriormente, el TCC es una estructura clave para la transmisión nociceptiva del sistema trigeminovascular, por lo tanto, medir los cambios de la actividad neuronal en esta estructura en respuesta a la estimulación nociva constituye un abordaje específico para estudiar los mecanismos fisiopatológicos y nuevos blancos terapéuticos de la vía trigeminal (Andreou et al., 2010).

Mediante el uso de técnicas electrofisiológicas podemos registrar de forma directa la actividad neuronal en tiempo real y por esta razón se realizaron registros electrofisiológicos de WDRn en el TCC para evaluar la respuesta de aferencias nociceptivas evocadas eléctricamente en el área supraorbital. La rama V1 inerva el área periorbital, mucosa intranasal y meninges (duramadre y piamadre) (Shankland, 2001). Dicho esto, es importante mencionar que las neuronas WDRn son células que se encuentran tanto en el asta dorsal de la medula espinal como en el Sp5c, de forma predominante a nivel de la lámina V (Hu et al., 2005).

Modelos electrofisiológicos han sido utilizados para evaluar la respuesta de diferentes fármacos en el sistema nervioso, un ejemplo claro es en modelos de migraña donde se analizan los efectos de los triptanes, dihidroergotamina (Goadsby

et al., 2015; Kaube et al., 1993), y antagonistas de los receptores de CGRP (Storer et al., 2004) sobre la actividad neuronal, por lo tanto el uso de este método para analizar la actividad evocada de aferencias nociceptivas trigeminales es el indicado para determinar el efecto de la OXT.

3. UBICACIÓN DEL PROYECTO

3.1. Justificación

El dolor craneofacial incluye un número de desórdenes y situaciones que afectan directamente el estado físico, emocional y social que deteriora la calidad de vida de la persona y su entorno (Macianskyté, et al. 2011). Diferentes patologías involucran la activación de la vía trigeminal, como las cefaleas, la migraña, la neuralgia del trigémino, la neuritis postherpética, la odontalgia, entre otras. Numerosos métodos y procedimientos se han implementado con la finalidad de tratar este tipo de dolor que se desencadena por diferentes padecimientos, ya sea por lesiones o procesos inflamatorios.

Una de las técnicas utilizadas experimentalmente y con fines clínicos ha sido la estimulación profunda en la región hipotalámica, la cual es aplicada en pacientes con tratamiento farmacológico refractario teniendo una eficiencia de mejoría en el 60% (Jügens et al. 2009; Leone, et al. 2010). Estos resultados muestran que la región hipotalámica participa en un sistema de analgesia endógena, sin embargo, aún no se saben las estructuras ni los mecanismos implicados en ello. En este sentido, los mecanismos hipotalámicos de modulación del dolor se han estudiado de manera experimental señalando entre otras estructuras del sistema nervioso central al núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) como estación central de un sistema endógeno de analgesia a nivel de la medula espinal. Se ha mostrado que la estimulación del PVN genera una reducción de la respuesta de fibras lentas A δ y C a nivel de la medula espinal generada por estímulos nocivos periféricos (Condés-Lara, et al., 2006) y la misma estimulación del PVN genera el mismo efecto en estudios conductuales (Shiraishi et al., 1995; Miranda-Cárdenas et al., 2006; De la Torre et al., 2009).

Las neuronas del PVN son las principales sintetizadoras y secretoras del nonapéptido OXT que ha mostrado ser parte de un mecanismo de analgesia a nivel espinal (Rojas-Piloni et al., 2010), por lo que resulta importante conocer su papel dentro de este sistema de modulación nociceptiva a nivel del TCC, dado que se ha reportado la presencia del OTR a nivel del núcleo espinal trigeminal utilizando técnicas de

inmunohistoquímica (Murata et al. 2011) mientras que el grupo de Gould, reporto la presencia del OTR de forma más abundante en el Sp5c comparado con el subnúcleo *oralis* o *interpolaris* (Gould y Zingg, 2003).

Este proyecto utilizó un modelo animal de nocicepción craneofacial para el registro electrofisiológico de la actividad neuronal del TCC. Este modelo no solo ha sido de gran ayuda para entender las enfermedades y desarrollar nuevos tratamientos sino también para estudiar la fisiopatología del dolor y en este caso en particular, la vía nociceptiva trigeminal (Bergerot et al., 2006).

3.2. Hipótesis

Las respuestas neuronales nociceptivas provocadas por estimulación supraorbital son inhibidas por la administración espinal de OXT. Este efecto antinociceptivo de la oxitocina es debido a la activación de:

H1: Receptores a OXT.

H2: Receptores a vasopresina 1_A.

3.3. Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Determinar si existe una modulación de la nocicepción en las WDRn del TCC al administrar OXT y determinar cuál es el receptor implicado, el OTR o el V_{1A}R.

3.3.2. Objetivos específicos

- a. Analizar el efecto de la OXT sobre la transmisión nociceptiva en el TCC.
- b. Determinar el receptor involucrado en la inhibición nociceptiva inducida por la OXT.

Investigar el receptor involucrado pretratando con un antagonista del OTR (L-368,899 20nmol) y un antagonista del V_{1A}R (SR-49059 20nmol y 200nmol).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sujetos de estudio

Se utilizaron 56 ratas Wistar macho, peso de 280g a 310g, en ciclos de luz-oscuridad 12/12h, a una temperatura de 22 ± 2 °C, 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 bajo los principios éticos de experimentación en animales establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, los cuales están acorde a los estatutos de i) las guías ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) y ii) las guías de “*Care and Use of the Laboratory Animals established by the National Institutes of Health*” (Publicación NIH No. 8023, 1978).

4.2. Procedimiento general

4.2.1. Procedimiento quirúrgico

Las ratas se introdujeron en una cámara herméticamente sellada y fueron anestesiadas con sevoflurano al 8% (v/v) colocado en un vaporizador con una mezcla de O₂ y N₂O (1:3). El plano anestésico se valoró juzgando la ausencia de reflejos oculares, el reflejo negativo de la cola y relajación corporal. Bajo estas condiciones se insertó una cánula endotraqueal para asistir con ventilación mecánica (56 ventilaciones por minuto), mantener anestesia a lo largo del experimento y registro continuo de CO₂ espirado (Capstar-100, CWI Inc., Ardmore, PA, USA). Posteriormente las ratas fueron montadas en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Para permitir el acceso al TCC, los músculos del cuello dorsal fueron separados, se realizó una laminectomía cervical (C1) y se retiraron las meninges para dejar expuesta el área del TCC. Para mantener una adecuada estabilidad de la medula espinal se colocó un gancho de fijación por debajo de la apófisis espinosa de C2. Los protocolos subsecuentes se realizaron con sevoflurano al 2.5% y se inmovilizó a los animales inyectando un bloqueador neuromuscular (2 mg/kg vía IM de pancuronio). Después de cada experimento se perfundió a los animales de forma intracardiaca (Ver sección de análisis histológico).

4.2.2. Registros electrofisiológicos extracelulares unitarios in vivo

Se realizaron registros extracelulares unitarios en neuronas WDR del TCC usando microelectrodos platino/tungsteno (impedancia 4-9 M Ω), montados en un sistema "Microdrive Eckhorn" (Thomas Recording GmbH, Giessen, Alemania). Primero se buscaron células que respondieran a la estimulación táctil del dermatoma localizado en la región supraorbital correspondiente a la rama V1. De forma subsecuente, se insertaron de forma subcutánea en la región supraorbital (en el campo receptivo periférico, CRP) dos electrodos de estimulación (agujas de calibre 27 G) conectadas a un estimulador eléctrico Grass S88, esto con el fin de evocar a través de estímulos eléctricos periféricos la actividad neuronal de fibras nociceptivas en el TCC. Tanto el electrodo de registro en el TCC como el de estimulación del CRP fueron colocados de forma ipsilateral.

La estimulación eléctrica consistió en la aplicación de 20 pulsos eléctricos de 1 milisegundo de duración (cada pulso), a una frecuencia de 0.5 Hz y con una intensidad de 0.1-3 mA. La actividad neuronal evocada fue registrada, amplificada (x1000), filtrada (300 Hz – 3 KHz), digitalizada, discriminada y analizada usando el *CED Hardware* y el *Spike2 Software* v5.15 de *Cambridge Electronic Design* (Reino Unido). Tanto la señal cruda como la discriminada fue visualizada primariamente en un osciloscopio conectado a su vez a un sistema de audio con el fin de discriminar no solo visualmente sino también auditivamente las señales neuronales evocadas. La actividad evocada de las WDRn del TCC fue registrada y analizada como histogramas peri-estímulo para detectar la incidencia de respuestas neuronales. De esta forma, se estimulaba el campo receptivo periférico (CRP) localizado en el área supraorbital y dependiendo del periodo de latencia de la actividad evocada se discriminaban entre fibras A δ y C. Esta latencia se obtuvo considerando la distancia entre el CRP y el sitio de registro del electrodo, y la velocidad de conducción de las fibras A δ y C.

Las respuestas neuronales evocadas fueron evaluadas antes (control basal) y después (al minuto 10, 20, 30, 40, 50 y 60 post-tratamiento) de aplicar OXT (0.2, 2 y 20 nmol; n=6 células para cada concentración) o el vehículo (n=6 células). El

papel del OTR y el V_{1A}R en el efecto de la OXT fue evaluado al administrar en grupos experimentales independientes los antagonistas selectivos de cada receptor: (i) L-368,899 (20 nmol; antagonistas al OTR); y (ii) SR-49059 (20 nmol y 200 nmol; antagonistas al V_{1A}R) (n=6 para cada grupo). En el caso de los grupos experimentales tratados con los antagonistas, estos se administraron 5 minutos antes de la OXT o el vehículo. Estos tratamientos fueron administrados a nivel del TCC (tópico) donde estaban colocados los electrodos usando un volumen de 20 μ l.

Finalmente, fue importante asegurar si la administración de los antagonistas de OTR (n = 6) y de V_{1A}R (n=6) o el vehículo carecían de un efecto *per se* en las respuestas nociceptivas evocadas.

4.2.3. Análisis histológico de los sitios de registro

Al final de los registros electrofisiológicos, los animales recibían una sobredosis de sevoflurano (8% v/v) y fueron transfundidos de forma intracardiaca, primero con solución salina y después con formaldehído al 10% (200 ml de cada uno). El tejido fue postfijado en formaldehído al 10% y se realizaron cortes coronales de 40 μ m con un microtomo (Leica Instruments BmbH, Nussloch, Alemania). Los sitios de registro se observaron en microscopio óptico.

4.3. Fármacos

Además de los anestésicos, se usaron los siguientes fármacos: acetato de oxitocina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA); clorhidrato de (2S)-2-amino-N-[(1S,2S,4R)-7,7-dimetil-1-[[[(4-(2-metilfenil)piperazinil]sulfonil)metil]biciclo[2.2.1]hept-2-il]-4-(metilsulfonil)butanamida (L-368,899; Tocris Bioscience, Northpoint, UK) y (2S)-1-[[[(2R,3S)-5-Cloro-3-(2-clorofenil)-1-[(3,4-dimetoxifenil)sulfonil]-2,3-dihidro-3-hidroxi-1H-indol-2-il]carbonil]-2-pirrolidin carboxamida (SR-49059 o relcovaptan; Tocris Bioscience, Northpoint, UK). La oxitocina fue disuelta en solución fisiológica salina mientras que el L-368,8999 y SR-49059 fueron disueltos en DMSO al 10%.

4.4. Presentación de datos y análisis estadístico

Los cursos temporales de las figuras mostradas en este texto son presentados como promedios \pm el error estándar de la media (E.E.M.) y como gráficas de cajas y bigotes para comparar el efecto global de los distintos tratamientos. En todos los casos el número de potenciales evocados inducidos por estimulación eléctrica en el campo receptivo de la rama oftálmica del trigémino, fueron normalizados y expresados como porcentaje de cambio con respecto a su respuesta basal. La respuesta basal fue establecida después de identificar una neurona que tuviera una variación \leq al 10% en las respuestas neuronales inducidas por la estimulación del campo receptivo en al menos 5 pruebas consecutivas (5 minutos entre cada prueba); en todos los casos no se identificaron *outliers* (usando la prueba de Grubb). Para evaluar la estabilidad de las neuronas registradas (grupo control y grupo vehículo) a lo largo de 60 minutos, se usó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas; no se asumió esfericidad y la corrección de los grados de libertad fueron hechos de acuerdo al método de Greenhouse-Geiser. Para comparar los valores de las respuestas neuronales de fibras A δ y C obtenidas antes (respuesta basal) y después de los tratamientos farmacológicos en los diferentes grupos, se usó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de una prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) (si aplicaba) para comparaciones múltiples. Finalmente, para comprar el global de la actividad neuronal entre diferentes tratamientos se utilizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni (si aplicaba). En todos los casos, una $P \leq 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

5. RESULTADOS

5.1. General

Los registros extracelulares en el TCC se realizaron en 60 WDRn con un campo receptivo cutáneo exclusivo de la región supraorbital de la rata correspondiente a la inervación de la rama oftálmica (V1) del nervio trigémino, con una distribución similar a reportes previos (Hu et al., 2005; Mørch et al., 2007). La mayoría de las neuronas registradas (~80%) se encontraban en la lámina V del asta dorsal, mientras que ~20% se encontraban entre las láminas II-IV. Las WDRn se registraron a una profundidad promedio de 1145 μm de la superficie. Estas neuronas fueron caracterizadas de acuerdo con las propiedades de su respuesta (tiempo de latencia) y fueron clasificadas como WDRn ya que se activaban tanto por estímulos nocivos como nocivos. En todos los casos, las WDRn registradas presentaron respuestas asociadas a la activación de fibras A δ y C después de la estimulación eléctrica del campo receptivo periférico (Figura 7).

5.2. Estabilidad de los registros electrofisiológicos

Dado que se registraron WDRn del TCC durante 60 minutos, se evaluó el efecto del tiempo en las respuestas nociceptivas neuronales provocadas por la estimulación eléctrica periférica. En el grupo control (n=6), el tiempo no tuvo efecto sobre las respuestas neuronales provocadas asociadas a la activación de fibras A δ ($F_{1.1994, 9.968} = 2.190$, $P = 0.1629$) o fibras C ($F_{2.130, 10.65} = 0.9711$, $P = 0.4151$). De forma similar, la administración del vehículo no tuvo efecto sobre la activación neuronal asociada a fibras A δ ($F_{2.366, 11.83} = 0.6938$, $P = 0.5418$) o fibras C ($F_{2.689, 13.44} = 2.902$, $P = 0.0780$) (n = 6) a lo largo del tiempo. En su conjunto, estos datos muestran que no hay cambios significativos en las respuestas neuronales provocadas en nuestros protocolos experimentales atribuibles al tiempo de duración del experimento.

5.3. La administración espinal de oxitocina inhibe la actividad nociceptiva evocada periféricamente en neuronas de segundo orden (WDRn) en el TCC

La Figura 8 muestra las respuestas neuronales asociadas a la activación de fibras A δ y C inducidas por estimulación periférica en el campo receptivo en las células

control (n = 6) y en las células pretratadas con OXT (0.2, 2 y 20 nmol; n = 6 células para cada concentración). En el caso de la actividad de las fibras A δ (Figura 8A), el ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que la OXT ($F_{3, 20} = 4.450$, $P = 0.015$) afecta la actividad neuronal de las neuronas de segundo orden de una forma tiempo-dependiente ($F_{6, 120} = 7.367$, $P = 0.0001$) y se detectó una interacción entre las distintas concentraciones usadas ($F_{18, 120} = 2.181$, $P = 0.0068$). Usando el procedimiento de comparaciones múltiples pareadas (SNK *post-hoc*) encontramos que esta inhibición fue más marcada (~20-25 % de inhibición) para los 20 nmol de OXT (desde el minuto 20 el minuto 60). Respuestas similares fueron obtenidas con la concentración de 2 nmol de OXT; en este caso la disminución de la actividad neuronal en el TCC (~20 % de inhibición) se observó a los minutos 50 y 60. Cuando se analizaron estos resultados como respuesta neuronal global (sumatoria temporal del porcentaje de actividad neuronal de una concentración de OXT) (Figura 8C), usando un ANOVA de una vía ($F_{3, 140} = 24.12$, $P < 0.0001$) seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni, encontramos que la OXT bloqueaba la entrada de información nociceptiva en las fibras A δ de forma dependiente de la concentración.

En el caso de fibras C (Figura 8B), el análisis estadístico reveló que los tratamientos ($F_{3, 20} = 8.469$, $P = 0.0008$) afectaron la actividad neuronal inducida periféricamente en las neuronas trigeminales de segundo orden de forma dependiente del tiempo ($F_{6, 120} = 11.58$, $P < 0.0001$); también se detectó una interacción entre las distintas concentraciones ($F_{18, 120} = 6.686$, $P < 0.0001$). Usando una prueba *post-hoc* SNK, se encontró que esta inhibición se observaba para: i) 2 nmol de oxitocina (~25-50 % de inhibición) desde el minuto 20; y ii) 20 nmol de OXT (~45-70 % de inhibición) a partir del minuto 10. Cuando se analizaron los resultados como respuesta neuronal global (sumatoria temporal del porcentaje de actividad neuronal de una concentración de OXT) (Figura 8D), usando un ANOVA de una vía ($F_{3, 140} = 43.71$, $P < 0.0001$) seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni, encontramos que la OXT bloqueaba la entrada de información nociceptiva en las fibras C de forma dependiente de la concentración.

La Figura 8E ejemplifica la inhibición inducida por OXT de la actividad neuronal nociceptiva del TCC de una sola célula antes y después (50 minutos) de la

administración de OXT (20 nmol). En el histograma peri-estímulo construido para esta neurona (**Figura 8F**) observamos que los eventos neuronales inducidos por los 20 pulsos eléctricos periféricos disminuyeron después de la administración de OXT, un efecto principalmente notorio en el componente de fibras C. En conjunto estos datos muestran que la OXT inhibe la entrada nociceptiva de la activación trigeminocervical evocada de forma periférica. En la **Figura 8E** y **Figura 8F** se observa el artefacto de estimulación, localizado entre 0mseg y 1.5mseg, sin embargo no se sobrepone a la actividad neuronal de fibras A δ .

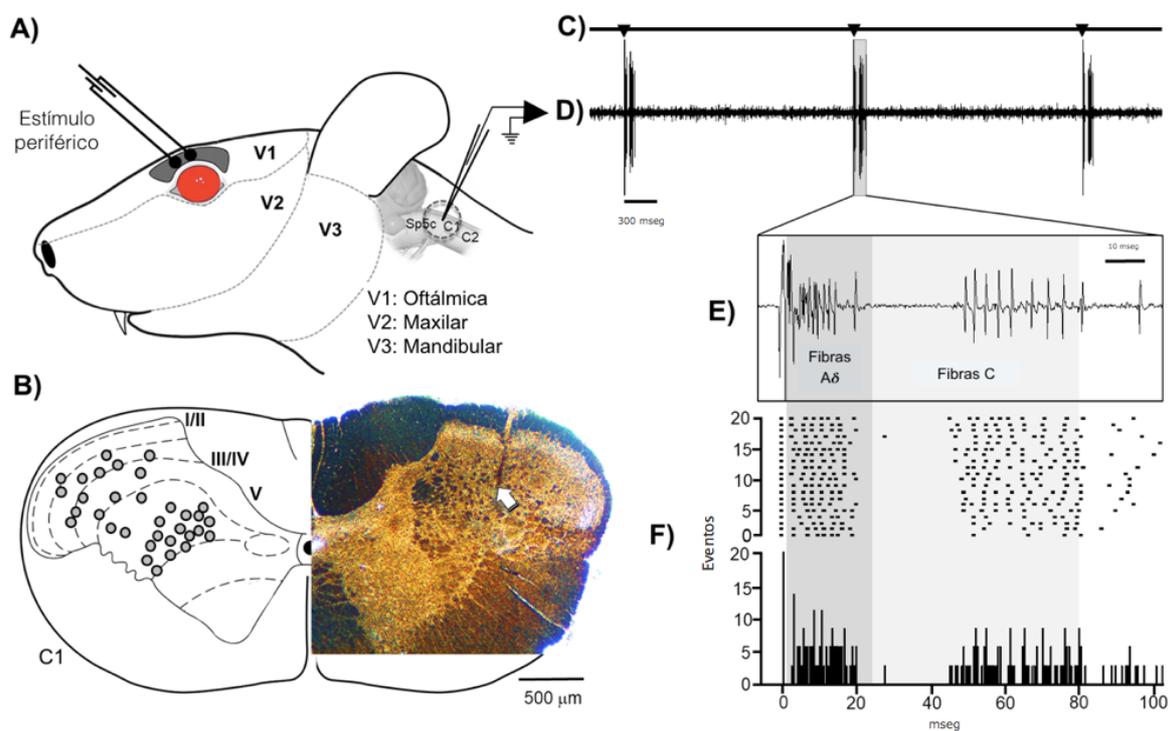


Figura 7. Estrategia experimental utilizada para los registros de WDRn en el TCC.

A) Esta imagen muestra la localización del campo receptivo periférico (en gris) de las neuronas estudiadas. Este campo receptivo corresponde a la primera rama del nervio trigémino (V1). Todas las neuronas se registraron usando microelectrodos de cuarzo platino/tungsteno (4-9 M Ω) colocados en la región del TCC. **B)** Resumen de la localización de los sitios de registro (izquierda) en el TCC y el ejemplo (derecha) de una microfotografía de un sitio lesionado donde se hizo el registro a nivel de C1. **C)** Se muestra el artefacto de 3 estímulos inducidos por estimulación eléctrica en el campo receptivo. **D)** Las respuestas neuronales (neuronas de segundo orden de amplio rango dinámico) inducidas por el estímulo eléctrico. **E)** Registro crudo de una respuesta neuronal inducida por un estímulo eléctrico en el campo receptivo y de acuerdo a su latencia temporal se discriminó en fibras A δ y C. **F)** *Raster-plot* (arriba) y el histograma peri-estímulo (abajo) obtenido de 20 respuestas a 20 estímulos eléctricos. Los periodos

de latencia representados por el componente A δ y C (fibras A δ : 3 - 25mseg; fibras C: 25 - 80 mseg).

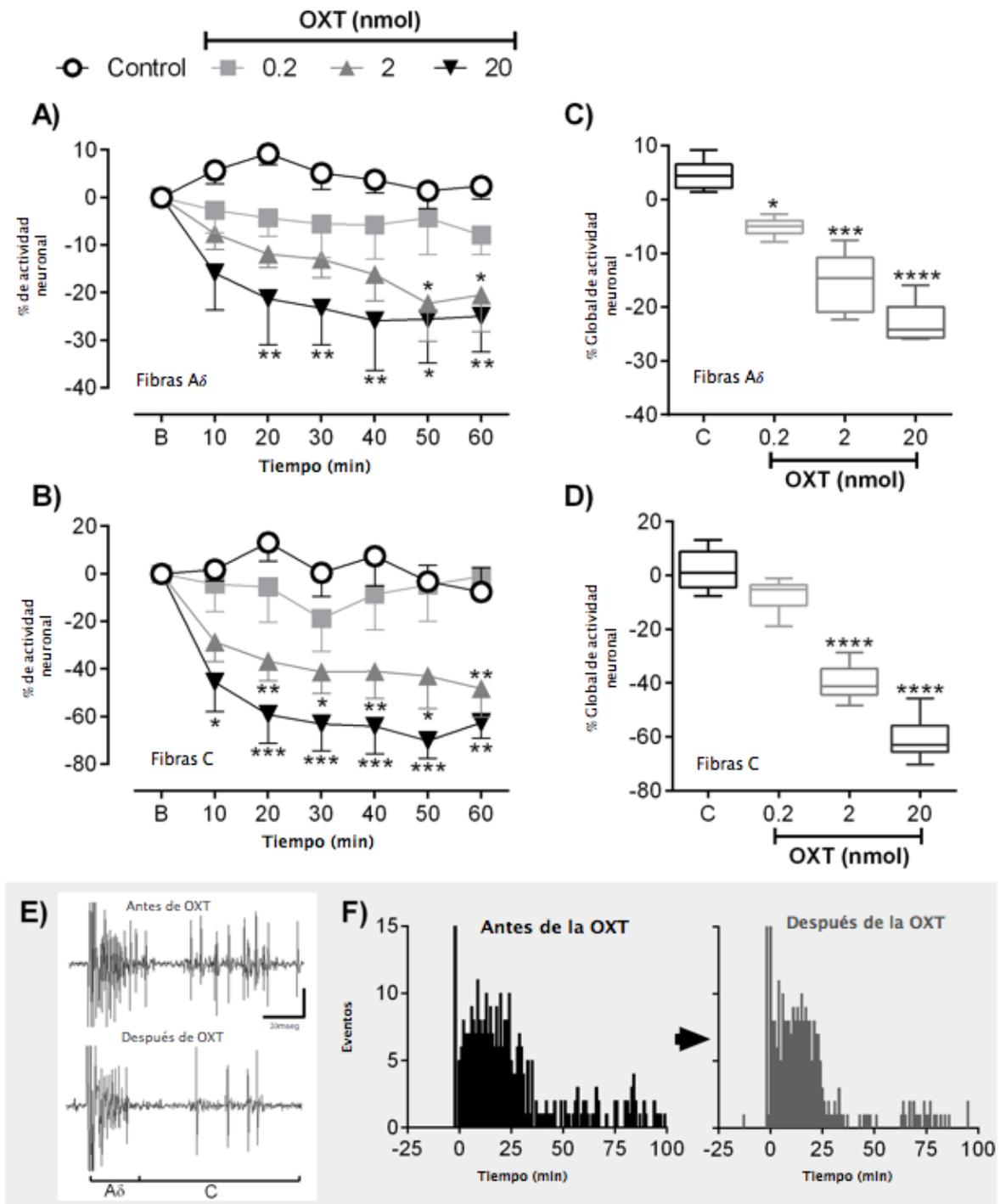


Figura 8. La oxitocina a nivel del TCC inhibe la actividad nociceptiva de neuronas de segundo orden WDR evocada por estimulación eléctrica periférica. A y B) Curso temporal (eje X) del efecto de la administración de oxitocina sobre la actividad neuronal expresada como porcentaje de cambio con respecto a su actividad basal (eje Y). En ambos casos se muestra la actividad neuronal inducida por estimulación eléctrica del campo receptivo en fibras A δ y C y los efectos de la

administración tópica de oxitocina (0.2, 2 y 20 nmol; n = 6 células cada concentración). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ diferencia estadística significativa comparando con la respuesta de grupo control. **C y D)** Muestra la actividad global neuronal de fibras A δ y C en respuesta a la administración de oxitocina. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs. el control. **E)** Se muestra la actividad neuronal de una neurona WDR evocada por un estímulo eléctrico antes (respuesta basal) y después (minuto 40) de la administración de oxitocina (20 nmol). **F)** Histograma peri-estímulo obtenido de 20 respuestas a 20 estímulos eléctricos antes (basal) y después (40 minutos) de la administración de oxitocina (20 nmol). Es interesante notar que el efecto antinociceptivo de la OXT fue más notorio en las fibras C que en las fibras A δ .

5.4. El antagonista del receptor a oxitocina (OTR) y no el del receptor a vasopresina V_{1A} bloquea la antinocicepción inducida por oxitocina en el TCC

Para investigar el receptor involucrado en la antinocicepción inducida por OXT, se usaron antagonistas del OTR y del V_{1A}R. La [Figura 9](#) muestra el efecto del pretratamiento con L-368,899 (20 nmol; antagonista de OTR) en el TCC de las respuestas neuronales de fibras A δ y C tratadas con OXT (20 nmol).

En el caso de fibras A δ pretratadas con L-368,899 o el vehículo ([Figura 9A](#)), el ANOVA de dos vías de medidas repetidas muestra que ninguno de los tratamientos ($F_{2, 15} = 0.6611$, $P = 0.5307$) ni el tiempo ($F_{6, 90} = 0.7784$, $P = 0.5890$) afectaron la actividad nociceptiva provocada, sugiriendo que el pretratamiento con este antagonista bloqueó la antinocicepción inducida por OXT. Resultados similares se obtuvieron en el caso de las fibras C ([Figura 9B](#)); $F_{2, 15} = 0.8131$, $P = 0.4621$ para el tratamiento y $F_{6, 90} = 0.7215$, $P = 0.6333$ para el tiempo. En ambos casos ([Figura 9](#)), en el ANOVA de una vía no se encontró ninguna diferencia en la actividad neuronal global ($F_{2, 105} = 2.73$, $P = 0.0671$, para la actividad de fibras A δ ; $F_{2, 105} = 4.338$, $P = 0.0655$, para la actividad de fibras C).

En contraste, en la [Figura 10](#), el ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló que al pretratar con SR-49059 (20 nmol o 200 nmol), dicho antagonista no tuvo efecto en la antinocicepción inducida por la OXT. De forma particular, en el caso de las fibras A δ ([Figura 10A](#)), el ANOVA de dos vías de medidas repetidas, demostró el efecto principal como diferencias entre grupos ($F_{3, 20} = 6.686$, $P = 0.0026$) e interacciones ($F_{18, 120} = 2.605$, $P = 0.0011$). La prueba *post-hoc* SNK demostró que el

SR-49059 más OXT inhibió la actividad neuronal de fibras A δ (~15 - 25%) en el TCC, empezando en el minuto 10 y durando hasta el minuto 60. Cuando se analizaron estos resultados como actividad neuronal global (sumatoria temporal del porcentaje de actividad neuronal de una concentración de OXT) (Figura 10B) usando un ANOVA de una vía ($F_{3, 140} = 34.65$, $P = 0.0001$) seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni, encontramos que el SR-49059 no tuvo ningún efecto en la inhibición inducida por oxitocina en la actividad de fibras A δ .

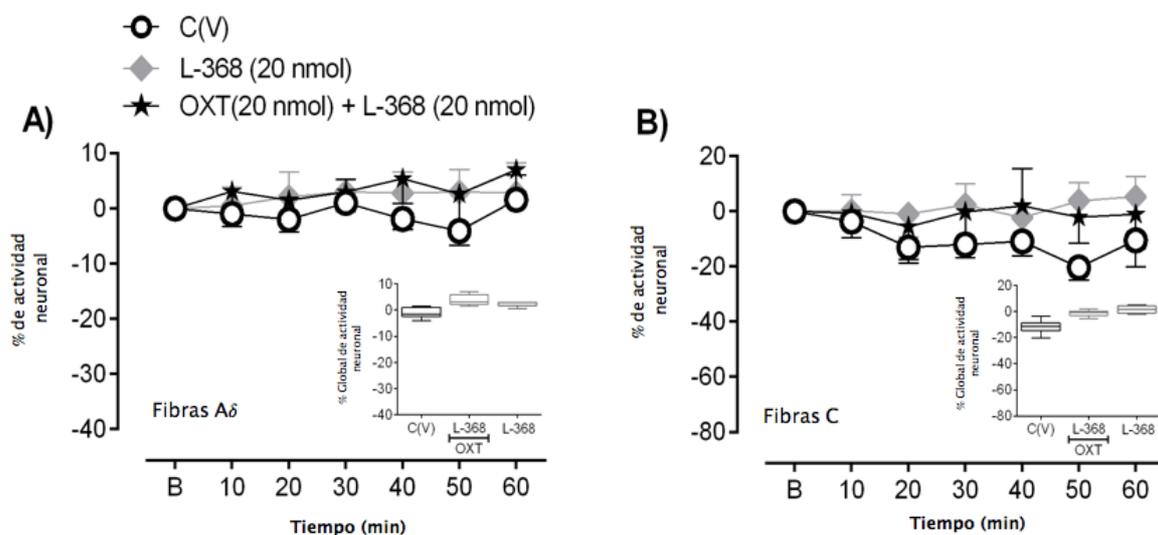


Figura 9. El papel del OTR en la antinocicepción inducida por oxitocina en el TCC. A y B) Muestra el efecto al pretratar con el antagonista de OTR (20nmol de L-368,899) sobre la antinocicepción inducida por OXT en neuronas de segundo orden en el TCC, este antagonista anula la inhibición inducida por oxitocina en la actividad neuronal asociada a la activación de las fibras A δ y C.

Efectos similares se observaron en el caso de fibras C (Figura 10C) para el tratamiento ($F_{3, 20} = 9.939$, $P = 0.0003$), para el tiempo ($F_{6, 120} = 13.64$, $P < 0.0001$) y para las interacciones ($F_{18, 120} = 4.560$, $P < 0.0001$). La prueba *pos hoc* de SNK mostró que el SR - 49059 no tuvo efecto sobre la antinocicepción inducida por OXT (fibras C; ~45 - 60% de inhibición), empezando en el minuto 10 y durando hasta el minuto 60. Analizando estos resultados como actividad neuronal global (sumatoria temporal del porcentaje de actividad neuronal de una concentración de OXT) (Figura 10D) y usando un ANOVA de una vía ($F_{3, 140} = 44.41$, $P < 0.0001$) seguido de una prueba *pos hoc* de Bonferroni, encontramos que el SR-49059 a 20 o 200 nmol no tuvo ningún efecto en la inhibición inducida por oxitocina en la actividad de fibras C.

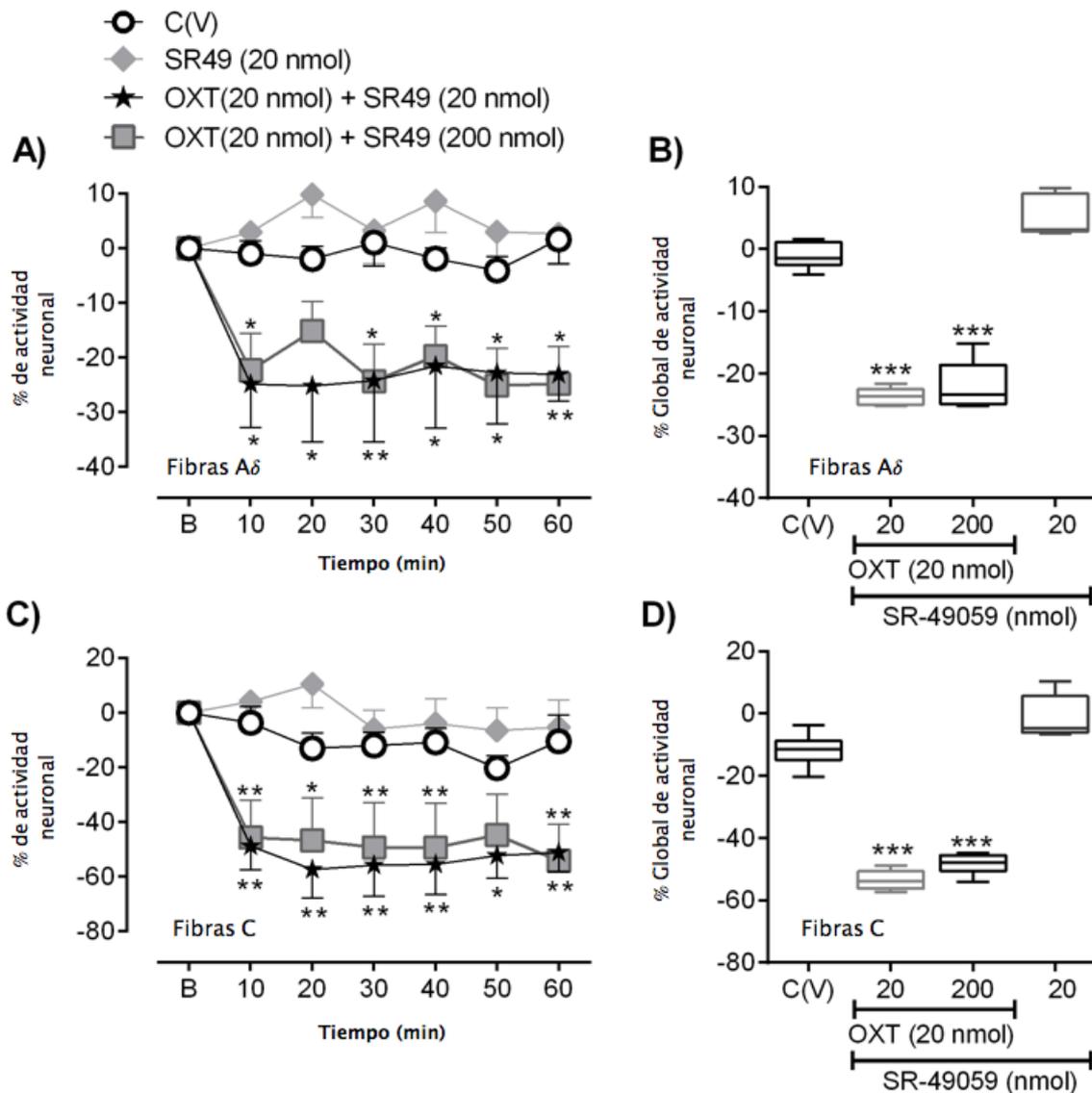


Figura 10. Exclusión del V_{1A}R en la antinocicepción espinal inducida por oxitocina en el TCC. A y C) Muestra que al pretratar con el antagonista de V_{1A}R (20nmol o 200nmol de SR-49059) no tuvo ningún efecto en la antinocicepción inducida por oxitocina. En C y D) se ilustra la actividad global neuronal de las fibras A δ y C entre los diferentes tratamientos, nótese que el pretratamiento con SR-49059 no tuvo ningún efecto (incluso a dosis supramáxima de 200nmol) en la inhibición de la respuesta nociceptiva inducida por oxitocina. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs C(V) (grupo control con vehículo).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

6.1. General

Este estudio electrofisiológico buscó entender las bases neurofarmacológicas de los mecanismos oxitocinérgicos que modulan la neurotransmisión nociceptiva en neuronas de segundo orden en el TCC. Es importante mencionar que, en todos los experimentos realizados, no se midió directamente la actividad de las fibras aferentes primarias (fibras A δ o C), sino que se analizó un tipo específico de neuronas de segundo orden, las WDRn. Dichas neuronas reciben información de las fibras A δ y C y por lo tanto responden a estímulos periféricos; en este caso dichos estímulos fueron realizados en el área supraorbital (inervada por la primera rama del nervio trigémino). Además de las implicaciones discutidas más adelante, estos datos demuestran que la OXT a nivel del TCC puede modular la nocicepción en neuronas que transmiten la información nociceptiva hacia sitios supraespinales. De forma particular, se demostró que la OXT administrada a este nivel, suprime los potenciales de acción evocados periféricamente que están asociados a la activación de las fibras nociceptivas A δ y C (% máximo de inhibición: >50% para fibras C y ~25% para fibras A δ ; [Figura 8](#)). Dado que la inhibición de la transmisión nociceptiva inducida por la OXT en el TCC fue bloqueada por el antagonista del OTR (L-368,899) y que se mantuvo sin alteraciones después de la administración del antagonista del V_{1A}R (SR-49059), se sugiere que existe un papel específico del OTR para la modulación de la entrada sensorial nociceptiva ([Figura 9](#), [10](#) y [11](#)). Estos resultados son similares a los reportados en neuronas WDRn a nivel del asta dorsal de la médula espinal ([Juif et al., 2013](#); [Moreno-López et al., 2013](#); [Rojas-Piloni et al., 2010](#)). Aun así, es importante señalar que el presente trabajo es el primer estudio que analiza directamente el efecto antinociceptivo así como el receptor involucrado a nivel del TCC, un área fundamental para la transmisión nociceptiva craneofacial.

6.2. La oxitocina bloquea las aferencias nociceptivas en neuronas del TCC a través del OTR

Dado que la administración local de OXT (2 y 20 nmol) inhibió la neurotransmisión trigeminal nociceptiva en el TCC (Figura 8), se sugiere la participación de mecanismos oxitocinérgicos. Reportes electrofisiológicos realizados a nivel espinal lumbar en neuronas WDR, demostraron que la OXT a una concentración de 10^{-6} M (i.e. ~ 0.2 nmol en 20 μ l) inhibe la actividad nociceptiva de dichas neuronas (Rojas-Piloni et al., 2007). En nuestros experimentos, 0.2 nmol de OXT no mostró ningún efecto sobre la transmisión neuronal nociceptiva provocada, un efecto que probablemente esté relacionado con la diferencia entre la expresión proteica del transcriptoma en la raíz de los ganglios dorsales (inervando la medula espinal) y el ganglio trigeminal (inervando el TCC) (Kogelman et al., 2017). La forma en que se procesa la nocicepción a nivel craneofacial parece ser diferente que en el resto del organismo (Schmidt et al., 2015). Es interesante notar que aun cuando las concentraciones de 2 y 20 nmol lograron bloquear la transmisión nociceptiva, el bloqueo de dicha actividad fue distinta (Figura 8A y 8B, cursos temporales). En el caso de la concentración de 20 nmol la inhibición se observó a partir del minuto 20, mientras que en el caso de la concentración 2 nmol la inhibición de la actividad neuronal fue estadísticamente significativa hasta el minuto 50.

El hecho de que el efecto de la OXT sobre la transmisión nociceptiva necesite tiempo para poder ejercer su efecto puede ser explicado considerando factores farmacodinámicos y farmacocinéticos, como por ejemplo: i) las concentraciones bajas de OXT tienen una menor probabilidad de interactuar con su receptor, por lo tanto, menor probabilidad de inducir una respuesta; y el ii) el tiempo necesario para alcanzar el sitio de acción el cual se localizaba a una profundidad promedio de 1145 μ m de la superficie. Por otra parte, resulta interesante notar que el efecto antinociceptivo de la OXT parece ser de larga duración. A pesar de no tener una explicación de por qué el efecto inhibitorio de la OXT en la nocicepción es tan prolongado, se han reportado en estudios farmacológicos (González-Hernández et al., 2017) y optogenética (Eliava et al., 2016) que la activación oxitocinérgica de

fibras C genera un efecto inhibitor por más de 40 min en registros de neuronas WDR a nivel de la región lumbar de la médula espinal.

En términos fisiológicos, se ha demostrado que existen proyecciones oxitocinérgicas del PVN hacia el asta dorsal de la médula espinal (Swanson and McKellar, 1979) y que la estimulación eléctrica de dicho núcleo induce antinocicepción (Condés-Lara et al., 2006). En el caso del TCC, se ha demostrado que hay proyecciones del PVN al Sp5c, donde proyectan las aferencias de la rama V1 (Abdallah et al., 2013; Robert et al. 2013); estos datos apoyan nuestra hipótesis acerca del posible papel de la OXT sobre la modulación de la actividad neuronal del TCC. De forma reciente, en un estudio realizado en ratas (Tsabazis et al., 2017), se demostró que al administrar intranasalmente (un área inervada por la rama V1 y V2 del trigémino) OXT marcada con I¹²⁵, esta no sólo difunde al Sp5c y a diferentes estructuras implicadas en el procesamiento del dolor, sino también disminuye la actividad neuronal del Sp5c lo que sugiere que la OXT modula la neurotransmisión en el TCC, pero no podemos excluir que dicho efecto sea secundario al tipo de administración (intranasal). Esto es, la administración intranasal puede activar distintas estructuras involucradas en la modulación de la nocicepción que de forma global pueden estar generando una modulación descendente en la actividad nociceptiva del TCC. De hecho, se ha postulado que la administración central de OXT o la estimulación del PVN bloquean la transmisión del dolor no solo por efectos directos sobre la médula espinal sino que también pueden potenciar mecanismos analgésicos descendentes interactuando con el locus coeruleus, el núcleo del rafe magno y la sustancia gris periacueductal (Caldwell et al., 1987; Condés-Lara et al., 2015; Ge et al., 2002; Lundeberg et al., 1994; Wang et al., 2013).

Los datos de esta tesis proveen evidencia sobre el papel de los mecanismos oxitocinérgicos a nivel del TCC, pero hasta este punto se desconoce el receptor implicado, dado que se utilizó un abordaje farmacológico, la OXT puede unirse no solo a los OTR, sino a los V_{1A}R, y un efecto inespecífico en este receptor podría estar contribuyendo al efecto de la OXT. Es por eso que el receptor involucrado (OTR vs V_{1A}R) en la antinocicepción inducida por OXT en el asta dorsal espinal es tema de debate (González-Hernández et al., 2014).

Para identificar los receptores involucrados, se usó un antagonista del OTR, el L-368,899 (rata pK_i :8.1; Williams et al., 1994) y el antagonista del $V_{1A}R$, el SR-49059 (rata pK_i :8.1-9.3; Serradeil-Le Gal et al., 1993). A pesar de que se han realizado diferentes estudios farmacológicos usando estos antagonistas para discriminar entre el OTR y el $V_{1A}R$ (Gupta et al., 2008; Mack et al., 2007; Thompson et al., 1997; Wilson et al., 2009) la concentración necesaria para bloquear el OTR o el $V_{1A}R$ en el TCC no se ha reportado. De este modo, se decidió utilizar una concentración equimolar (*i.e.* la misma concentración de OXT necesaria para bloquear la transmisión nociceptiva) considerando que la OXT tiene una afinidad similar por el OTR (pK_i :8.2) y el $V_{1A}R$ (pK_i : 8.3) que los antagonistas usados (Alexander et al., 2015).

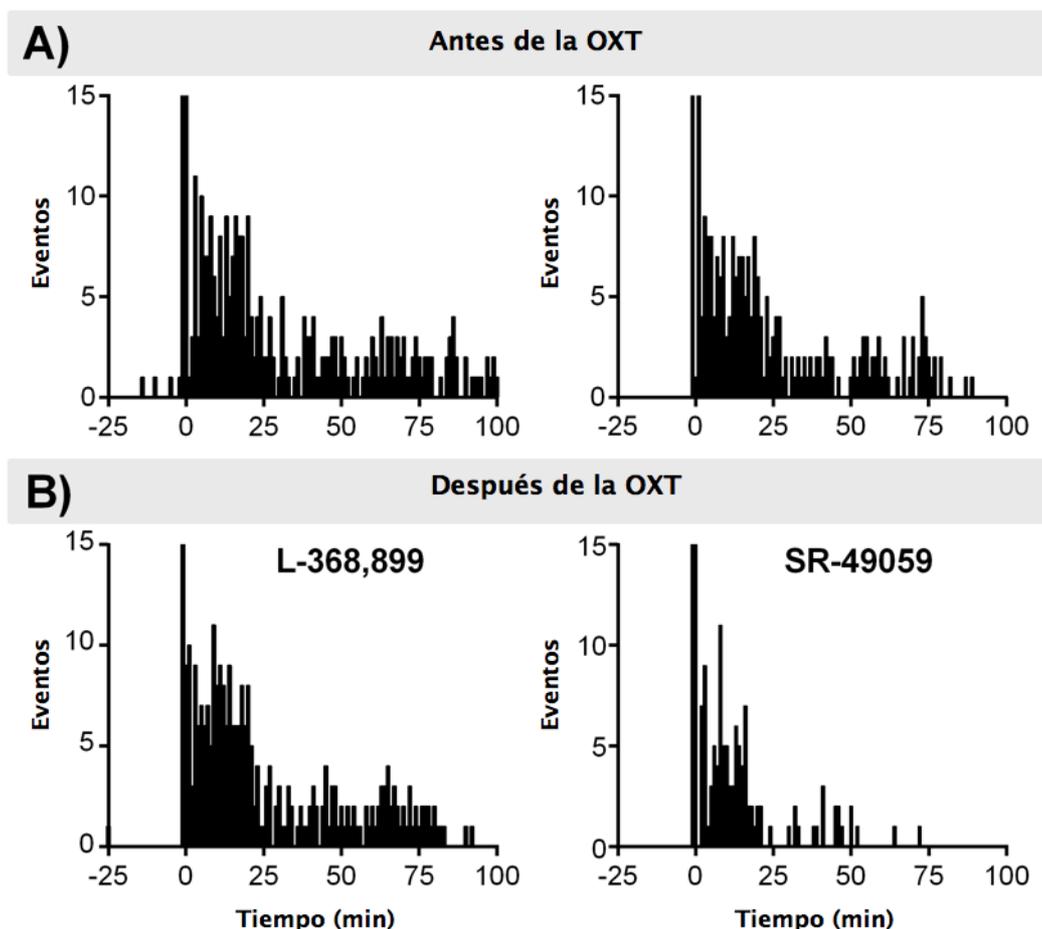


Figura 11. Histogramas peri-estímulo obtenidos antes (**A**; basal) y 40 min después (**B**) de administrar OXT (20nmol) más el antagonista de OTR (izquierda) o $V_{1A}R$ (derecha). Nótese que después de pretratar con un antagonista selectivo de OTR (20nmol L-368,899) la antinocicepción inducida por OXT fue abolida mientras que 20nmol de SR-49059 no tuvo efecto.

6.3. Otras evidencias apoyando el papel del OTR a nivel del TCC

Los resultados de la presente tesis muestran que la inhibición de las respuestas nociceptivas inducidas por OXT son mediadas por la activación del OTR a nivel del TCC particularmente a nivel de lámina V y en menor medida II, III y IV. Estos datos son consistentes con diversos trabajos realizados tanto a nivel de neuronas del ganglio trigeminal como de aferencias nociceptivas de neuronas provenientes del ganglio de la raíz dorsal. Por ejemplo, a nivel del ganglio trigeminal, donde analizó la expresión de OTR (Kubo et al., 2017; Tzabazis et al., 2016) se demostró que: i) el OTR co-localiza con fibras nociceptivas CGRPérgicas; ii) la oxitocina bloquea la liberación de CGRP inducida por capsaisina en nociceptores meningeos (usando un modelo *ex-vivo*) y iii) que en inflamación orofacial aumenta la expresión de OTR. Es importante considerar que el $V_{1A}R$ también se expresa en el ganglio trigeminal (Kubo et al., 2017), pero de acuerdo con nuestros datos asumimos que este receptor no está involucrado. En este sentido Schorscher-Petcu (2010) demostró que los sitios de unión a la OXT están restringidos a las láminas superficiales (donde se procesa la información nociceptiva) del asta dorsal, mientras que los sitios de unión a la vaporesina se presentan de forma difusa en la sustancia gris de la médula espinal. Ciertamente, se requieren más estudios para definir el papel del $V_{1A}R$ en la nocicepción a nivel del TCC. Y en todo caso, estos estudios apoyan el papel del OTR, que probablemente esté presente en las fibras aferentes primarias (González-Hernández et al., 2017) que proyectan al TCC y están involucradas en la antinocicepción craneofacial inducida por OXT.

6.4. Consideraciones finales e implicaciones clínicas

Dado que el TCC es un sitio importante para la integración de señales nociceptivas periféricas en el sistema nervioso, vale la pena considerar la posible relevancia clínica de estos resultados, particularmente en procesos dolorosos que impliquen la activación de la vía nociceptiva trigeminal. Dicho esto, es importante considerar que en tejidos humanos, usando autoradiografía competitiva para visualizar el OTR con ornitina-vasotocina I^{125} (radioligando específico de OXT) se demostró que la OXT se une a sitios dentro del núcleo espinal del trigémino (Freeman et al., 2017); y lo más

interesante, dicho marcaje no fue desplazado por el antagonista del V_{1A}R (usando SR-49059) lo que excluye a este receptor.

Finalmente, debemos considerar una limitación importante, estos experimentos electrofisiológicos se llevaron a cabo en ratas macho y la OXT se ha visto implicada en el dimorfismo sexual de diversos procesos (e.g. reproducción, aprendizaje, memoria y comportamiento social (Glimp y Fahrenholz, 2001). También se ha visto que la densidad de los sitios de unión a la OXT en el sistema nervioso central está ligado a las hormonas esteroideas gonadales (Tribollet et al., 1990; Kremerik et al., 1991). En este sentido, Uhl-Bronner et al. (2005), demostró mediante autoradiografía semicuantitativa en la médula espinal de ratas adulto, que los sitios de unión a OXT, son más densos en ratas macho que en las ratas hembra. Estos datos correlacionan con un estudio conductual reciente (inflamación inducida con carragenina), donde muestran que la inyección intratecal de 0.125 nmol de oxitocina en machos desencadenaba antinocicepción mientras que para obtener el mismo efecto en ratas hembra eran necesarios 1.25nmol (Chow et al., 2016). En conjunto estos estudios sugieren que el efecto antinociceptivo de la OXT puede variar dependiendo del sexo de la rata, siendo menos efectiva en ratas hembra. Es importante considerar esta diferencia en investigaciones posteriores ya que se ha propuesto el uso terapéutico de la OXT para el manejo del dolor.

6.5. Conclusiones

Usando un abordaje electrofisiológico y farmacológico, mostramos que la oxitocina inhibe la actividad neuronal inducida eléctricamente en el TCC al activar directamente el OTR. Estos resultados, en su conjunto, muestran que los OTR a este nivel inhiben las aferencias nociceptivas periféricas provenientes de la primera rama del nervio trigémino.

7. REFERENCIAS

- Abdallah K, Artola A, Monconduit L, Dallel R y Luccarini P. 2013. Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus *caudalis* in rats. *PloS One*. 8: 3008-3022.
- Akerman S y Goadsby PJ. 2005. The role of dopamine in a model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 314:162–169.
- Akerman S, Holland PR y Goadsby PJ. 2011. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat. Rev. Neuroscience*. 12: 570-584.
- Akerman S, Holland PR y Hoffmann J. 2013. Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of migraine: dural trigeminovascular nociception. *Cephalalgia*. 33:577–592.
- Alexander SPH, Davenport AP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA y CGTP Collaborators. 2015. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol*. 172: 5744-5869.
- Amaral DG y Sinnamon HM. 1977. The locus *coeruleus*: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog Neurobiol* 9: 147–196.
- Andreou AP, Summ O, Charbit AR, Romero-Reyes M y Goadsby PJ. 2010. Animal models of headache: from bedside to bench and back to bedside. *Expert Rev Neurother*. 10: 389–411.
- Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS y Goadsby PJ. 2001. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet*. 357: 1016–1017.
- Bartsch T y Goadsby PJ. 2005. Anatomy and physiology of pain referral in primary and cervicogenic headache disorders. *Headache Currents*. 2: 42-48.
- Bartsch T y Goadsby PJ. 2003. The trigeminocervical complex and migraine: current concepts and synthesis. *Current Pain Headache Reports*. 7: 371-376.
- Bartsch T y Goadsby PJ. 2001. Stimulation of the greater occipital nerve (GON) enhances responses of dural responsive convergent neurons in the trigeminocervical complex in the rat. *Cephalalgia* 21: 401-402.
- Bartsch T, Levy MJ, Knight YE y Goadsby PJ. 2004. Differential modulation of nociceptive dural input to [hypocretin] orexin A and B receptor activation in the posterior hypothalamic area. *Pain*. 109: 367–78.

- Basbaum A y Fields HL. 1978. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 4: 451–462.
- Bereiter DA, Hargreaves KM y Hu JW. 2009. Trigeminal mechanisms of nociception: Peripheral and brainstem organization. *Basbaum Science of Pain Chapter 32*: 435-450
- Bergerot A, Holland P, Akerman S, Bartsch T, Ahn A, Maassen Van Den Brink A, Reuter U, Tassorelli C, Schoenen J, Mitsikostas D y Goadsby PJ. 2006. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. *European Journal of Neuroscience*. 24: 1517–1534.
- Breton JD. 2008. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in laminae I–II which amplify GABAergic inhibition. *Mol. Pain* 11: 4-19.
- Brito GA, Sachs D, Cunha FQ, Vale ML, Lotufo C, Ferreira SH y Ribeiro R. 2006. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine/NO/cGMP/PKG/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Eur. J. Neurosci*. 24: 1175-1181.
- Burstein R, Yamamura H, Malick A y Strassman AM. 1998. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 79: 964-982.
- Burstein R, Cliffer KD y Giesler GJ Jr. 1987. Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *J Neurosci* 7: 4159-4164.
- Busch V, Frese A y Bartsch T. 2004. The trigeminocervical complex. Integration of peripheral and central pain mechanism in primary headache syndromes. *Schmerz*. 18: 404-410.
- Caldwell JD, Mason GA, Stanley DA, Jerdack G, Hruby VJ, Hill P, Prange AJ y Pedersen CA. 1987. Effects of nonapeptide antagonists on oxytocin and arginine vasopressin-induced analgesia in mice. *Regul. Peptides*. 18: 233-241.
- Carmichael MS, Humbert R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W y Davidson JM. 1987. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab*. 64: 27–31.
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR y Goadsby PJ. 2009. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal

- firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci.* 29: 12532–12541.
- Chichorro JG, Porreca F y Sessle B. 2017. Mechanisms of craniofacial pain. *Cephalalgia.* 37: 613-626.
- Chow LH, Chen YH, Wu WC, Chang EP y Huang EYK. 2016. Sex Difference in Oxytocin-induced anti-hyperalgesia at the spinal level in rats with intraplantar carrageenan-induced inflammation. *PLoS One* 11,0162218.
- Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jimenez J y 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, López-Hidalgo M y Rodríguez-Jimenez J. 2009. Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells. *Brain Res.* 1247: 38-49.
- 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, Condés-Lara M, Díaz-Martínez y Rodríguez-Jimenez 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, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López-Hidalgo M y Freund-Mercier MJ. 2006. Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res.* 1081: 126-137.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G y Rodríguez-Jiménez J. 2007. Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Res.* 1160: 20-29.
- Craig AD. 2003. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci.* 26: 1-30.

- Dalkvist J, Ekblom K y Waldenlind E. 1984. Headache and mood: a time-series analysis of self-ratings. *Cephalalgia* 4: 45–52.
- DeLaTorre S, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J, Villanueva L y Condes-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.
- Du Vigneaud VRC, Swan JM, Roberts CW y Katsoyannis PG. 1954. Oxytocin: Synthesis. *J Am Chem Soc* 76:4.
- Eliava M, Melchior M, Kochbloch-Bollmann HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, Ciobanu AC, del Rio RT, Roth LC, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demouliere N, Busnelli M, Chini B, Tan LL, Mitre M, Froemke RC, Chao MV, Giese G, Sprengel R, Kuner R, Poisbeau P, Seeburg PH, Stoop R, Charlet A y Grinevich V. 2016. A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron* 89: 1291-1304.
- Evans RW y Couch R. 2001. Orgasm and migraine. *Headache*. 41: 512-514.
- Fernandes EC, Luz LL, Mytakhir O, Lukoyanov NV, Szucs P y Safronov BV. 2016. Diverse firing properties and A β -, A δ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I. *Pain*. 157: 475-487.
- Fields HL, Heinricher MM y Mason P. 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Ann Rev Neurosci*. 14: 219–245.
- Fields HL y Heinricher MM. 1985. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308: 361–374.
- Freeman SM, Smith AL, Goodman MM y Bales KL. 2017. Selective localization of oxytocin receptors and vasopressin 1a receptors in the human brainstem. *Soc. Neuroscience* 273: 12-23.
- Ge Y, Lundeberg T y Yu LC. 2002. Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Res*. 927: 204-207.
- Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 81: 629–683.
- Goadsby PJ, 2012. Pathophysiology of migraine. *Ann Indian Acad Neurol*. 15: 15-22.

- Goadsby PJ, Charbit AR, Andreou AP, Akerman S, y Holland PR. 2009. Neurobiology of migraine. *Neuroscience*. 161: 327-341.
- Goder R, Fritzer G, Kapsokalyvas A, Kropp P, Niederberger U, Strenge H, Gerber WD y Aldenhoff JB. 2001. Polysomnographic findings in nights preceding a migraine attack. *Cephalalgia* 21: 31–37.
- Gong L, Gao F, Li J, Yu X, Ma X, Zheng W, Cui S, Liu K, Zhang M, Kunze W, Liu y CY. 2015. Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca²⁺/nNOS/NO/K ATP pathway. *Neuroscience* 289: 417-428.
- González-Hernández A, Manzano-García A, Martínez-Lorenzana G, Tello-García I A, Carranza M, Arámburo C y Condés-Lara M. 2017. Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons. *Pain*. 158: 2117-2128.
- González-Hernández A, Rojas-Piloni G y Condés-Lara M. 2014. Oxytocin and analgesia: future trends. *Trends Pharmacol. Sci.* 35: 549-551.
- Gould BR y Zingg HH. 2003. Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor-LacZ reporter mouse. *Neuroscience*. 122: 155-167.
- Grewen KM, Davenport RE y Light KC. 2010. An investigation of plasma and salivary oxytocin responses in breast- and formula-feeding mothers of infants. *Psychophysiology*. 47: 625–632.
- Gupta J, Russell RJ, Wayman CP, Hurley D y Jacson VM. 2008. Oxytocin-induced contractions within rat and rabbit ejaculatory tissues are mediated by vasopressin V1A receptors and not oxytocin receptors. *Br. J. Pharmacol.* 155:118-126.
- Hobo S, Hayashida K y Eisenach JC. 2012. Oxytocin inhibits the membrane depolarization-induced increase in intracellular calcium in capsaicin sensitive sensory neurons: a peripheral mechanism of analgesic action. *Anesth. Analg.* 114: 442-449.
- Holland PR y Goadsby PJ. 2007. The hypothalamic orexinergic system: pain and primary headaches. *Headache* 47: 951-962.

- Holland PR, Saengjaroentharn C y Vila-Pueyo M. 2018. The role of brainstem in migraine: Potential brainstem effects of CGRP and CGRP receptor activation in animal models. *Cephalalgia*. 1-13.
- Hoshiyama E, Tatsumoto M, Iwanami H, Saisu A, Watanabe H y Inaba N. 2012. Postpartum migraines: a long-term prospective study. *Intern Med*; 51:3119–3123.
- Hoskin KL, Zagami A, Goadsby PJ. 1999. Stimulation of the middle meningeal artery leads to Fos expression in the trigeminocervical nucleus: a comparative study of monkey and cat. *J Anat* 194: 579-588.
- Hoskin KL, Bulmer CDE, Lasalandra M, Jonkman A, Goadsby PJ. 2001. Fos expression in the midbrain periaqueductal grey after trigeminovascular stimulation. *J Anat*. 198: 29-35.
- Hu JW. 1990. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus *caudalis* (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain*. 41: 331-345.
- Hu JW, Sun KQ, Vernon H y Sessle BJ. 2005. Craniofacial inputs to upper cervical dorsal horn: implications for somatosensory information processing. *Brain Res*. 1044: 93-106.
- Jiang C. 2014. Synaptic modulation and inward current produced by oxytocin in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *J. Neurophysiol*. 111, 991–1007.
- Juif PE y Poisbeau P. 2013. Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain* 154: 1449-1456.
- Julius D y McCleskey. 2006. Cellular and molecular properties of primary afferent neurons.
- Jürgens T, Leone M, Proietti-Cecchini A, Busch V, Mea E, Bussone G y May A. 2009. Hypothalamic deep-brain stimulation modulates thermal sensitivity and pain thresholds in cluster headache. 146: 84-90.
- Kagan R, Kainz V, Burstein R y Nosedá R. 2013. Hypothalamic and basal ganglia projections to the posterior thalamus: possible role in modulation of migraine headache and photophobia. *Neuroscience*. 248: 359-68.

- Kaube H, Keay KA, Hoskin KL, Bandler R, Goadsby PJ. 1993. Expression of *c-Fos*-like immunoreactivity in the caudal medulla and upper cervical cord following stimulation of the superior sagittal sinus in the cat. *Brain Res* 629: 95-102.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ y Okayama H. 1992. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356: 526-529.
- Kogelman LJA, Christensen RE, Pedersen SH, Bertalan M, Hansen TF, Jansen-Olesen I y Olesen J. 2017. Whole transcriptome expression of trigeminal ganglia compared to dorsal root ganglia in *Rattus Norvegicus*. *Neuroscience*. 350:169-179.
- Kremarik P, Freund-Mercier MJ y Stoeckel ME. 1991. Autoradiographic detection of oxytocin-and vasopressin-binding sites in various subnuclei of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Effects of functional and experimental sexual steroid variations. *J. Neuroendocrinol.* 3: 689-698.
- Kubo A, Shinoda M, Katagiri A, Takeda M, Suzuki T, Asaka J, Yeomans DC, e Iwata K. 2017. Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury through vasopressin-1A receptors of the rat trigeminal ganglia. *Pain* 158: 649-659.
- Kuwabara Y, Takeda S, Mizuno M y Sakamoto S. 1987. Oxytocin levels in maternal and fetal plasma, amniotic fluid, and neonatal plasma and urine. *Arch Gynecol Obstet.* 241: 13-23.
- Lawson SN y Waddell PJ. 1991. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol.* 435: 41-63.
- Leone M, Franzini A, Proietti A, Broggi G y Bussone G. 2010. Hypothalamic deep brain stimulation in the treatment of chronic cluster headache. 3: 187-195.
- Leston JM. 2009. Functional anatomy of the trigeminal nerve. 55: 99-112
- Liu Y, Broman J y Edvinsson L. 2008. Central projections of the sensory innervation of the rat middle meningeal artery. *Brain Res* 1208: 103-110.
- Liu Y, Broman J, Zhang M y Edvinsson L. 2009. Brainstem and thalamic projections from a craniovascular sensory nervous centre in the rostral cervical spinal dorsal horn of rats. *Cephalalgia* 29: 935-948.

- Liu Y, Chou KH, Lee PL, Fuh PL, Niddam DM, Lai KL, Hsiao FJ, Lin YY, Chen WT, Wang SJ y Lin CP. 2017. Hippocampus and amygdala volume in relation to migraine frequency and prognosis. *Cephalalgia* 37:1329-1336.
- Lloyd DP y Chang HT. 1948. Afferent fibers in muscle nerves. *J Neurophysiol.* 11: 199-207.
- Lovick TA y Robinson JP. 1983. Bulbar raphe neurones with projections to the trigeminal nucleus caudalis and the lumbar cord in the rat: a fluorescence double-labelling study. *Exp Brain Res* 50: 299–308.
- Lundeberg T, Uvnäs-Moberg K, Agren G y Bruzelius G. 1994. Anti-nociceptive effects of oxytocin in rats and mice. *Neurosci Lett.* 170: 153-157.
- Macianskytė D, Januzis G, Kubilius R, Adomaitienė V y Sciupokas A. 2011. Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia. *Medina (Kaunas)*
- Mack SO, Wu M, Kc P y Haxhiu MA. 2007. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in Pre-Bötzinger complex. *J. Appl. Physiol.* 102,189-199.
- Malick A, Burstein R. 1998. Cells of origin of the trigeminohypothalamic tract in the rat. *J Comp Neurol* 400: 125-144.
- Malick A, Strassman AM y Burstein R. 2000. Trigeminohypothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J Neurophysiol* 84: 2078–2112.
- Mazzuca M, Minlebaev M, Shakirzyanova A, Tyzio R, Taccola G, Janackova S, Gataullina S, Ben-Adri Y, Giniatullin R y Khazipov R. 2011. Newborn analgesia mediated by oxytocin during delivery. *Front. Cell. Neurosci.* 75-83.
- McNaughton FL y Feindel WH. 1977. Innervation of intracranial structures: a reappraisal. *Physiological Aspects of Clinical Neurology*, edited by Rose FC. Oxford: Blackwell Scientific. 279-293.
- Miranda-Cardenas Y, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López-Hidalgo M, Freund-Mercier M y Condés-Lara M. 2006. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain.* 122: 182–189.

- Mørch CD, Hu JW, Arendt-Nielsen L y Sessle BJ. 2007. Convergence of cutaneous, musculoskeletal, dural and visceral afferents onto nociceptive neurons in the first cervical dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.* 26: 142-154.
- Moreno-López Y, Martínez-Lorenzano G, Condés-Lara M y Rojas-Piloni G. 2013. Identification of oxytocin receptor in the dorsal horn and nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Neuropeptides.* 47: 117–123.
- Murata Y, Li MZ y Masuko S. 2011. Developmental expression of oxytocin receptors in the medulla oblongata and pons. *Neuroscience letters.* 502: 157-161.
- Nosedá R y Burstein R. 2013. Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain* 154: S44–S53.
- Ong JJY, Wei DYT y Goadsby PJ. 2018. Recent advances in Pharmacotherapy for Migraine Prevention: From Pathophysiology to New Drugs. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. 1179-1950.
- Panda S y Hogenesch JB. 2004. It's all in the timing: many clocks, many outputs. *J Biol Rhythms* 19: 374–387.
- Phillips WJ, Ostrovsky O, Galli RL y Dickey S. 2006. Relief of acute migraine headache with intravenous oxytocin: report of two cases. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 20: 25–8.
- Qiu F, Qiu CY, Chi H, Liu TT, Qu ZW, Yang Z, Li JD, Zhou QY y Hu WP. 2014. Oxytocin inhibits the activity of acid-sensing ion channels through the vasopressin, V1_A receptor in primary sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* 171: 3065–3076.
- Ray BS y Wolff HG. 1940. Experimental studies on headache. Pain sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg* 41:813-856.
- Robert C, Bourgeois L, Arreto C, Condés-Lara M, Nosedá R, Jay T y Villanueva L. 2013 Paraventricular Hypothalamic Regulation of Trigeminovascular Mechanisms Involved in Headaches. *J Neurosci.* 15;33: 8827-8840.
- Rojas-Piloni G, López-Hidalgo M, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez_jiménez J y Condés-Lara M. 2007. GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Res.* 1137: 69–77.

- Rojas-Piloni G, Mejía-Rodríguez R, Marínez-Lorenzana G y Condés-Lara M. 2010. Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.* 476: 32–35.
- Rousselot P, Papadopoulos G, Merighi A, Poulain DA y Theodosis DT. 1990. Oxytocinergic innervation of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Res.* 529: 178–184.
- Russo R, D'Agostino G, Mattace-Raso G, Avagliano C, Cristiano C, Meli R Y Calignano A. 2012. Central administration of oxytocin reduces hyperalgesia in mice: implications for cannabinoid and opioid systems. *Peptides* 38, 81–88.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW y Cowan WM. 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res.* 117: 305–12.
- Schmidt K, Schurke O, Forkmann K y Bingel U. 2015. Enhanced Short-Term Sensitization of Facial Compared With Limb Heat Pain. *16*: 781-790.
- Schorscher-Petcu A, Sotocinal S, Ciura S, Dupre A, Ritchie J, Sorge RE, Crawley JN, Hu SB, Nishimori K, Young LJ, Tribollet E, Quirion R y Mogil JS. 2010. Oxytocin-induced analgesia and scratching are mediated by the vasopressin-1A receptor in the mouse. *J. Neurosci.* 30: 8274-8284.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, García C, Lacour C, Guiraudou P, Christophe B, Villanova G, Nisato D, Maffrand JP, y Le Fur G. 1993. Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J. Clin Invest.* 92: 224-231.
- Sessle BJ. 2000. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *11*: 57-91.
- Settle M. 2000. The hypothalamus. *Neonatal Netw* 19: 9–14.
- Shankland WE 2001. The trigeminal nerve. Part II: the ophthalmic division. *Cranio.* 19: 8-12.
- Shimizu, T., Suzuki, N., 2011. Biological sciences related to headache, in: Nappi, G. and Moskowitz, M.A., (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 97. Elsevier, Amsterdam. 35-45.
- Shiraishi T, Onoe M, Kojima T, Sameshima Y y Kageyama T. 1995. Effects of auricular stimulation on feeding-related hypothalamic neuronal activity in normal and obese rats. *Brain Res Bull* 36: 141-148.

- Storer RJ, Akerman S y Goadsby PJ. 2004. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular transmission in the cat. *Br J Pharmacol.* 142: 1171-1181.
- Swanson LW y McKellar S. 1979. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 188: 87-106.
- Thompson KL, Vincent SH, Miller RR, Colletti AE, Alvaro RF, Wallace MA, Feeney WP y Chiu SHL. 1997. Pharmacokinetics and disposition of the oxytocin receptor antagonist L-368,899 in rats and dogs. *Drug Metab Dispos.* 25: 1113-1118.
- Tracey I. Imaging pain. 2008. *Br J Anaesth* 101: 32-39
- Tribollet E, Audigier S, Dubois-Dauphin M y Dreifuss JJ. 1990. Gonadal steroids regulate oxytocin receptors but not vasopressin receptors in the brain of male and female rats. An autoradiographical study. *Brain Res.* 511: 129-140.
- Tzabazis A, Kori S, Mechanic J, Miller J, Pascual C, Manering N, Carson D, Klukinov M, Spierings E, Jacobs D, Cuellar J, Frey WH 2nd, Hanson L, Angst M, Yeomans DC. 2017. Oxytocin and migraine headache. *Headache.* 57: 64-75.
- Tzabazis A, Mechanic J, Miller J, Pascual C, Manering N, Carson D, Klukinov M, Spierings E, Jacobs D, Cuellar J, Frey WH2nd, Hanson L, Angst M, Yeomans DC. 2016. Oxytocin receptor: expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia.* 36: 943-950.
- Uhl-Bronner S, Waltisperger E, Martinez-Lorenzana G, Condés-Lara M y Freund-Mercier MJ. 2005. Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. *Neuroscience* 135: 147-154.
- Veinante P, Jacquin MF y Deschenes M. 2000. Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol* 420: 233-243.
- Wall and Melzack's. 2013. *Textbook of Pain*. Sexta edición. Elsevier
- Wang YL, Yuan Y, Yang J, Wang CH, Pan YJ, Lu L, Wu YQ, Wang DX, Lv LX, Li RR y Xue L. 2013. The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. *Neuropeptides.* 47: 93-97.
- Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV. 1995. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med.* 1: 658-660.

Williams PD, Anderson PS, Ball RG, Bock MG, Carroll L, Chiu SH, Clineschmidt BV, Culberson JC y Erb JM. 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. *J. Med. Chem.* 37: 565-571.

Wilson LA, Wayman CP y Jackson M. 2009. Neuropeptide modulation of a lumbar spinal reflex: potential implications for female sexual function. *J. Sexual Med.* 6: 947-957.

8. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inervación trigeminal en la rata	3
Figura 2. Clasificación de las fibras nerviosas aferentes en el ganglio de la raíz dorsal y en el ganglio trigeminal	4
Figura 3. Proyección de aferentes primarias y subnúcleos trigeminales ...	5
Figura 4. Convergencia de aferentes primarias en el TCC	7
Figura 5. Proyecciones ascendentes y descendentes de la vía trigeminal..	9
Figura 6. Modulación descendente de la vía nociceptiva trigeminal	10
Figura 7. Estrategia experimental utilizada para los registros de WDRn en el TCC.....	26
Figura 8. La OXT a nivel del TCC inhibe la actividad nociceptiva evocada periféricamente en neuronas de segundo orden WDRn	27
Figura 9. El papel del OTR en la antinocicepción inducida por OXT en el TCC	29
Figura 10. Exclusión del V _{1A} R en la antinocicepción espinal inducida por OXT en el TCC	30
Figura 11. Histogramas peri-estímulo	34

9. APÉNDICE

9.1. Participación en congresos

9.1.1 Presentación oral del tema “Control oxitocinérgico de las respuestas nociceptivas en el Complejo Trigeminocervical en un modelo de migraña” en el LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas 2017. Monterrey N.L., México.

9.1.2. Presentación del poster titulado “*The role of oxytocin receptors modulating nociception at the level of the Trigemino-cervical Complex.*” en el Congreso de la *Society for Neuroscience* 2017. Washington, D.C. EUA.

9.2. Artículo publicado

9.2.1 García-Boll E, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A. Oxytocin inhibits the rat medullary dorsal horn Sp5c/C1 nociceptive transmission through OT but not V1A receptors. *Neuropharmacology*. 2018; 129: 109-17.