



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA OXITOCINA PERIFÉRICA SOBRE LA TRANSMISIÓN DE LA
INFORMACIÓN NOCICEPTIVA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALFREDO DE JESÚS MANZANO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL CONDÉS LARA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARTHA LEÓN OLEA
DR. JORGE ALBERTO LÓPEZ ÁVILA
FACULTAD DE MEDICINA

JURIQUILLA QUERÉTARO, MAYO DE 2019



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.

Índice

1. Resumen	1
2. <i>Abstract</i>	2
3. Marco teórico	4
3.1 Oxitocina y vasopresina	4
3.2 Generalidades de la fisiología del dolor	7
3.2.1 Mecanismos de la nocicepción periférica	7
3.2.2 Mecanismos de la nocicepción central	10
3.3 Introducción a las funciones antinociceptivas de la oxitocina y la vasopresina	11
3.3.1 Acciones centrales antinociceptivas de la oxitocina	11
3.3.2 Acciones centrales antinociceptivas de la vasopresina	13
3.3.3 Antecedentes de la modulación periférica antinociceptiva de la oxitocina	14
3.3.4 Antecedentes de la modulación periférica antinociceptiva de la vasopresina	17
3.3.5 Receptores involucrados en la antinocicepción mediada por oxitocina y vasopresina	18
4. Planteamiento del problema y preguntas de investigación	20
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	21
7. Materiales y métodos	22
7.1 Animales	22
7.2 Compuestos	22
7.3 Experimentos electrofisiológicos	24
7.3.1 Procedimiento quirúrgico	24
7.3.2 Registros electrofisiológicos	25
7.3.3 Diseño experimental (electrofisiología)	25
7.3.4 Análisis de los datos obtenidos en los experimentos electrofisiológicos	26
7.4 Experimentos conductuales	28
7.4.1 Modelo de dolor agudo inducido por formalina	28
7.4.1.1 Análisis de los datos obtenidos en el modelo de formalina	29
7.4.2 Modelo de coordinación motora con <i>Rotarod</i>	29
7.4.2.1 Análisis de los datos obtenidos en el modelo de Rotarod	30

7.5	<i>Western blot</i>	30
7.6	Histología	32
7.6.1	Inmunofluorescencia de las fibras aferentes primarias	32
7.6.2	Microscopía confocal y análisis de imágenes	33
8.	Resultados	34
8.1	Experimentos electrofisiológicos	34
8.1.1	Efecto de la administración periférica de oxitocina sobre la actividad evocada en neuronas de amplio rango dinámico	34
8.1.2	Participación del receptor de oxitocina en el efecto de la administración de oxitocina	34
8.1.3	Participación del receptor de vasopresina V1a en el efecto de la administración de oxitocina	35
8.1.4	Efecto de la administración periférica de vasopresina sobre la actividad evocada de neuronas de amplio rango dinámico	39
8.1.5	Participación del receptor de vasopresina V1a en el efecto de la administración de vasopresina	40
8.1.6	Participación del receptor de oxitocina en el efecto de la administración de vasopresina	40
8.1.7	Disminución del CO2 espirado posterior a la administración periférica subcutánea de vasopresina	44
8.2	Experimentos conductuales	45
8.2.1	Conducta nociceptiva inducida por formalina.....	45
8.2.1.1	Efecto de la administración periférica de oxitocina sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina	45
8.2.1.2	Efecto del antagonista del receptor de oxitocina sobre la acción antinociceptiva de la oxitocina	45
8.2.1.3	Efecto del antagonista del receptor de vasopresina V1a sobre la acción antinociceptiva de la oxitocina	46
8.2.1.4	Efecto de la administración periférica de vasopresina sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina	47
8.2.1.5	Efecto del antagonista del receptor de vasopresina V1a sobre la acción	

antinocepsiva de la vasopresina	48
8.2.1.6 Efecto del antagonista del receptor de oxitocina sobre la acción antinocepsiva de la vasopresina	49
8.2.2 Conducta motriz evaluada con <i>Rotarod</i>	51
8.3 Expresión del OTR en el nervio ciático evaluado por <i>Western blot</i>	52
8.4 Localización de OTR y V1aR por microscopía confocal	53
9. Discusión	58
9.1 Efecto antinocepsivo de la administración subcutánea de oxitocina	59
9.1.1 Evidencias electrofisiológicas	59
9.1.2 Evidencias conductuales	59
9.1.3 Complementariedad de los efectos encontrados	60
9.1.4 Otros mecanismos posibles de la OXT periférica	61
9.2 Efecto antinocepsivo de la administración subcutánea de vasopresina	61
9.2.1 Evidencias electrofisiológicas	62
9.2.2 Evidencias conductuales	63
9.2.3 Interpretación de los datos obtenidos, distinción del efecto local del efecto sistémico	63
9.2.4 Otros mecanismos posibles de la AVP periférica	64
9.3 Receptores involucrados en los efectos antinocepsivos de la oxitocina y vasopresina	65
9.3.1 Evidencias farmacológicas del papel del OTR y V1aR	65
9.3.2 Evidencias por biología molecular e histología de la presencia de OTR y V1aR en terminaciones nerviosas periféricas	67
10. Consideraciones finales y perspectivas del proyecto	68
11. Bibliografía	70
12. Publicaciones derivadas de la presente tesis	78

Abreviaciones

ABC: Área bajo la curva

ARD: Amplio rango dinámico

AVP: Vasopresina

CGRP: Péptido relacionado al gen de la calcitonina

CRP: Campo receptivo periférico

IB4: Isolectina B4

ip: Intraperitoneal

Ki: Constante de inhibición

L3: L368,899 antagonista específico del receptor de oxitocina.

NPV: Núcleo paraventricular

OTR: Receptor de oxitocina

OXT: Oxitocina

sc: Subcutánea

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SR: SR49059 antagonista específico del receptor 1a de vasopresina.

V1aR: Receptor de vasopresina 1a

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 597467.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por facilitar asignaturas, recursos y herramientas necesarios para mi formación.

El presente proyecto fue realizado en el laboratorio de dolor y epilepsia del Instituto de Neurobiología, UNAM Juriquilla, 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 IN200415 (Dr. Miguel Condés Lara) y IA203117 (Dr. Abimael González Hernández).

Quiero agradecer a mi tutor principal, el Dr. Miguel Condés Lara por haberme guiado durante todos estos años, demostrándome con su ejemplo la pasión por la investigación, el cuidado por cada detalle técnico e intelectual, y la perseverancia y disciplina que se requieren para realizar un proyecto de investigación.

A mi comité tutor, por sus recomendaciones y retroalimentación en cada etapa del doctorado.

Al jurado del examen de grado, por sus recomendaciones y retroalimentación de esta tesis.

A los miembros del laboratorio. Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana por su apoyo y enseñanza en las técnicas de de inmunofluorescencia y microscopía. Dr. Abimael González Hernández por su asesoramiento y retroalimentación en el desarrollo del proyecto. Y a mis compañeros del laboratorio por sus sugerencias y apoyo brindado.

A mi esposa Laura, por brindarme su cariño y apoyo durante todos estos años y motivarme a superarme en cada momento. A mi familia, Eréndira, Alfredo y Andrea por su cariño y apoyo.

1. Resumen

La oxitocina (OXT) y la vasopresina (AVP) son dos neuropéptidos con múltiples funciones neuroendocrinas, una de ellas es la modulación de la nocicepción. Si bien la administración periférica de ambos péptidos puede producir antinocicepción, poco se ha estudiado sobre el sitio de acción donde actúan estas neurohormonas. El presente estudio explora si la administración vía subcutánea de OXT y AVP produce antinocicepción periférica local, qué receptores participan en ella y la localización de los mismos.

En la primera parte analizamos mediante registros extracelulares unitarios de neuronas de amplio rango dinámico de la médula espinal, si la administración de OXT o AVP en el campo receptivo periférico modifica en estas neuronas la actividad evocada por fibras A β , A δ y C. Posteriormente, utilizamos los modelos conductuales de dolor inducido por formalina y de coordinación motriz con *Rotarod* para conocer si la inyección subcutánea de OXT o AVP produce analgesia conductual y efectos motores, respectivamente. Además, investigamos con el uso de antagonistas específicos si los receptores de OXT (OTR) y de AVP (V1aR) participan en dicha acción antinociceptiva. Finalmente, buscamos la presencia de estos los receptores en terminaciones nerviosas periféricas mediante *Western blot* e inmunofluorescencia.

Tanto la OXT como la AVP inyectadas en el campo receptivo periférico producen una disminución de la actividad evocada por fibras A δ y C, lo que se interpreta como un efecto antinociceptivo. Asimismo, ambos péptidos producen analgesia conductual en el modelo de formalina. Sin embargo, la inyección de AVP se acompaña de notorios efectos sistémicos y sobre la motricidad. Nuestros resultados apuntan a que el efecto antinociceptivo de la OXT y de la AVP es de tipo local, puesto que la administración subcutánea en una zona distinta a la que recibe el estímulo nocivo no produce antinocicepción. Finalmente, se encontramos la proteína del OTR expresada en

el nervio ciático y reportamos por primera vez en la literatura la presencia de OTR y V1aR en terminaciones nerviosas de la piel.

En resumen, nuestros resultados indican que tanto la OXT como la AVP producen antinocicepción periférica local. La evidencia farmacológica e histológica señala que los OTR y V1aR participan en las funciones antinociceptivas de ambas neurohormonas. Finalmente, la AVP parece tener menor potencial como medicamento antinociceptivo por la acentuada respuesta sistémica que evoca.

2. Abstract

Oxytocin (OXT) and vasopressin (AVP) are two neuropeptides with multiple neuroendocrine functions, one of which is nociceptive modulation. Although the peripheral administration of both peptides can produce antinociception, little has been studied about the site of action where these neurohormones act. The present study explores whether subcutaneous administration of OXT and AVP produces local peripheral antinociception, which receptors participate in it and their localization.

In the first part of the study, we analyze through extracellular unitary recordings of wide dynamic range spinal cord neurons, if the OXT or AVP administration in the receptive field modifies the activity of these neurons evoked by A β , A δ and C fibers. Subsequently, we used the behavioral models of formalin-induced pain and motor coordination with Rotarod to know if the subcutaneous injection of OXT or AVP produces behavioral analgesia and motor effects, respectively. Moreover, we investigate, with the use of specific antagonists, if the OXT (OTR) and AVP (V1aR) receptors participate in the antinociceptive action. Finally, we evaluated the presence of these

receptors in peripheral nerve endings through Western blotting and immunofluorescence microscopy.

Both OXT and AVP injected into the receptive field produce a decrease in the activity evoked by A δ and C fibers, an action that is interpreted as an antinociceptive effect. Likewise, both peptides produce behavioral analgesia in the formalin test. However, AVP injection is accompanied by notorious systemic and motor effects. Our results suggest that the OXT and AVP antinociceptive action is locally produced since subcutaneous administration in a different area than the one receiving the noxious stimulus does not produce antinociception. Finally, we found OTR protein expression in the sciatic nerve and report for the first time in literature the presence of OTR and V1aR in nerve endings of the skin.

In summary, our results indicate that both OXT and AVP produce local peripheral antinociception. The pharmacological and histological evidence suggests that the OTR and V1aR participate in the antinociceptive functions of both neurohormones. Finally, AVP seems to have less potential as an antinociceptive drug because it evokes marked systemic responses.

3. Marco teórico

3.1 Oxitocina y vasopresina

En el sistema nervioso central (SNC), la oxitocina (OXT) y la vasopresina (AVP, de las siglas de arginina-vasopresina) son dos neuropéptidos sintetizados y secretados por 3 núcleos hipotalámicos: supraóptico, paraventricular y accesorio. Las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular proyectan sus axones a la hipófisis posterior (neurohipófisis) desde donde liberan OXT y AVP a la circulación sistémica para actuar como hormonas. Otro tipo de neuronas, las parvocelulares, se localizan en el núcleo paraventricular, cuyas proyecciones se dirigen a distintas áreas del SNC (sistema límbico, eminencia media, tallo encefálico y médula espinal, entre otros), en estas regiones los péptidos liberados actúan como neuromoduladores (Stoop, 2012). Además del hipotálamo otros órganos periféricos (incluyendo las glándulas suprarrenales, ovarios, útero, testículos y piel) pueden sintetizar OXT o AVP; en estos tejidos, las hormonas actúan de manera paracrina o autocrina (Arnold et al., 2002; Deing et al., 2013).

Para realizar sus funciones fisiológicas tanto a nivel periférico como a nivel central la OXT y la AVP se unen y activan a sus receptores. Se considera que la OXT tiene un solo tipo de receptor denominado receptor de oxitocina (OTR, por las siglas en inglés de *oxitocin receptor*). Este receptor es de tipo metabotrópico por lo que está acoplado a proteínas G, principalmente a proteínas $G\alpha_q$, las cuales incrementan la actividad de la fosfolipasa C (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Sin embargo, el acoplamiento a otras proteínas G, incluyendo $G\alpha_i$, las cuales disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa, también se reportó en la literatura (Busnelli et al., 2012). Mientras tanto, la AVP tiene 3 tipos de receptores V1a, V1b y V2; los primeros dos están acoplados a

proteínas $G\alpha_q$ mientras que el último está unido a proteínas de tipo $G\alpha_s$, las cuales aumentan la actividad de la adenilil ciclasa (Raggenbass, 2008).

La OXT y la AVP son muy similares en su secuencia (nonapéptidos que solo varían en 2 aminoácidos) y tienen la particularidad de unirse y activar a los receptores propios de ambos péptidos; posiblemente esta característica les permite actuar de manera paralela en algunas funciones. Actualmente conocemos que la OXT puede unirse y activar a los receptores V1a, V1b y V2, mientras que la AVP puede unirse y activar al OTR. Sin embargo, la afinidad de unión entre ligando y receptor difiere para cada una de las combinaciones. Tomando en cuenta la constante de inhibición (K_i) de la OXT y AVP para los distintos receptores, encontramos que la OXT se une con mayor afinidad a su receptor ($K_i 0.79\pm 0.22$ nM) con respecto a los receptores de la AVP (K_i V1a: 64 ± 12 , V1b: 167 ± 12 , V2: 1782 ± 79 nM); mientras que resulta interesante que la AVP se une con similar afinidad a sus receptores (K_i V1a: 1.7 ± 0.08 , V1b: 1.1 ± 0.1 , V2: 1.1 ± 0.05 nM) y al OTR ($K_i 1.65\pm 0.49$ nM) (Koshimizu et al., 2012). A pesar de esto, los receptores de ambos péptidos tienen una distribución diferente en los distintos órganos, lo que podría explicar las distintas funciones biológicas de la OXT y la AVP. Por ejemplo, los OTR se expresan principalmente en el útero (miometrio y endometrio), en las células mioepiteliales mamarias, en riñones, corazón y distintas áreas del sistema nervioso (SN) (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Mientras que los receptores V1a se encuentran en lechos vasculares, plaquetas, hígado, glándulas suprarrenales y SN; los V1b en la hipófisis anterior y los V2 en los túbulos colectores renales (Koshimizu et al., 2012). La localización de estos receptores coincide con las principales funciones atribuidas a ambos péptidos como describimos a continuación.

La OXT y la AVP tienen funciones bien conocidas y ampliamente descritas. Resumiendo, la OXT es una hormona fundamental en el trabajo de parto, actuando como uterotónico y en la lactancia,

favoreciendo el reflejo de eyección de leche (Gimpl y Fahrenholz, 2001). En estudios recientes, se describieron nuevos papeles de la OXT en la regulación inmune (Li et al., 2017) y metabólica (Amri y Pizani, 2016). Mientras que las acciones mejor descritas de la AVP son el control de la diuresis, de la osmolaridad plasmática y la regulación de la presión sanguínea a través de sus efectos renales y vasculares (Koshimizu et al., 2012); por otra parte, también se conoce su participación en la respuesta inmune, en el control de la proliferación celular y en el metabolismo (Mavani et al., 2015).

Además de sus funciones hormonales clásicas, ambos péptidos participan en distintos procesos del sistema nervioso entre ellos la regulación de la conducta social (Benarroch, 2013). Sobre esta última, se han investigado múltiples funciones incluyendo el uso social de la detección de olores, recompensa social, interacción social, agresión, preferencia sexual y comportamiento parental (Johnson y Young, 2017). Estas funciones están reguladas por el efecto de la OXT y la AVP sobre la amígdala, hipotálamo, septum lateral y sustancia gris periacueductal entre otros sitios (Smith et al., 2019). Es interesante mencionar que la OXT puede mediar sus funciones sobre la conducta social a través de la activación de los receptores de AVP, mientras que la AVP puede producir conductas sociales a través de su unión a receptores de OT (Smith et al., 2019). Otra función conjunta de la OXT y la AVP es la modulación central y periférica de la nocicepción y el dolor (Caldwell et al., 1987; Yang, 1994; Condés-Lara et al., 2005; 2006; 2008; Miranda-Cardenas et al., 2006; Martínez-Lorenzana et al., 2008; Rojas-Piloni et al., 2008; DeLaTorre et al., 2009; González-Hernández et al., 2014; Mavani et al., 2015; Xin et al., 2017) sobre estas funciones profundizaremos a continuación.

3.2 Generalidades de la fisiología del dolor

El dolor se define como una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño real o potencial en un tejido, o descrito en términos de dicho daño (IASP Task Force, 1994). Esta modalidad sensitiva tiene el propósito de proteger al organismo de estímulos dañinos potenciales y se manifiesta con respuestas somatosensitivas y emocionales (Kucyi y Davis, 2017). Es importante aclarar que el dolor se presenta como una experiencia altamente subjetiva mientras que el término nocicepción se refiere a los procesos celulares y moleculares que participan en la transducción, transmisión, procesamiento y modulación de los estímulos nocivos (Sneddon, 2018).

3.2.1 Mecanismos de la nocicepción periférica

El estímulo dañino suele ser de tipo mecánico, térmico, químico o inflamatorio. Una de las funciones del sistema nervioso periférico (SNP) es responder a los estímulos nocivos o potencialmente nocivos transduciendo, transmitiendo y modulando la señal nociceptiva. Las células del SNP encargadas de esto son los nociceptores. Los nociceptores son neuronas sensoriales primarias cuyos cuerpos celulares se localizan en los ganglios de la raíz dorsal; estas células son de tipo pseudounipolar, es decir tienen solamente un axón que se bifurca en una rama que se dirige al tejido periférico (terminaciones nerviosas libres) y otra rama que proyecta a las láminas superficiales de las astas dorsales de la médula espinal (Basbaum et al., 2009).

Los nociceptores poseen distintas clases de receptores que se activan con moléculas específicas o fenómenos físicos de carácter nocivo; en general se considera que hay receptores para estímulos térmicos, mecánicos y químicos (Perl, 1968; Basbaum et al., 2009). Las proyecciones axónicas de donde nacen las terminaciones nerviosas libres pueden ser clasificadas por su diámetro, grado de

mielinización y velocidad de conducción. Considerando estas variables, las fibras que transmiten de forma normal la información nociceptiva son las fibras C (diámetro pequeño, mielinización ausente y lenta conducción) y las fibras A δ (diámetro pequeño y mediano, poca mielinización e intermedia velocidad de conducción). En contraste, las fibras que transmiten información no nociceptiva, por ejemplo el tacto, son clasificadas como de tipo A β (diámetro grande, mielinizadas y rápida conducción) (**Tabla 1, Fig. 1**). La excitación de las fibras A δ y C evoca sensaciones dolorosas distintas. La actividad de las primeras produce un dolor de tipo agudo y bien localizado, denominado “primer dolor o epicrítico”; mientras que las segundas evocan un dolor sostenido, sordo y mal localizado, denominado “segundo dolor o protopático” (**Fig. 1**).

Además de la clasificación anterior los nociceptores pueden ser categorizados por el tipo de estímulo que los activa en térmicos, mecánicos, polimodales y silentes y por la expresión de distintos marcadores bioquímicos, e.g. péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) o isolectina B4 (IB4) (Dubin y Patapoutian, 2010). Respecto a este último método de clasificación se reportó que las neuronas CGRP + suelen poseer fibras de tipo C y A δ , mientras que las neuronas IB4+ predominantemente tienen fibras de tipo C (Snider y McMahon, 1998).

Tipo de fibra	Mielinización	Diámetro	Velocidad
Fibras A β	Mielinizadas	6 – 12 μm	30 a 70 m/s*
Fibras A δ	Poco mielinizadas	2 – 5 μm	3 a 30 m/s*
Fibras C	Amielínicas	0.4 – 1.2 μm	0.1 a 1.4 m/s*

Tabla 1: Clasificación de las fibras de las neuronas aferentes primarias.

*Dubin y Patapoutian, 2010.

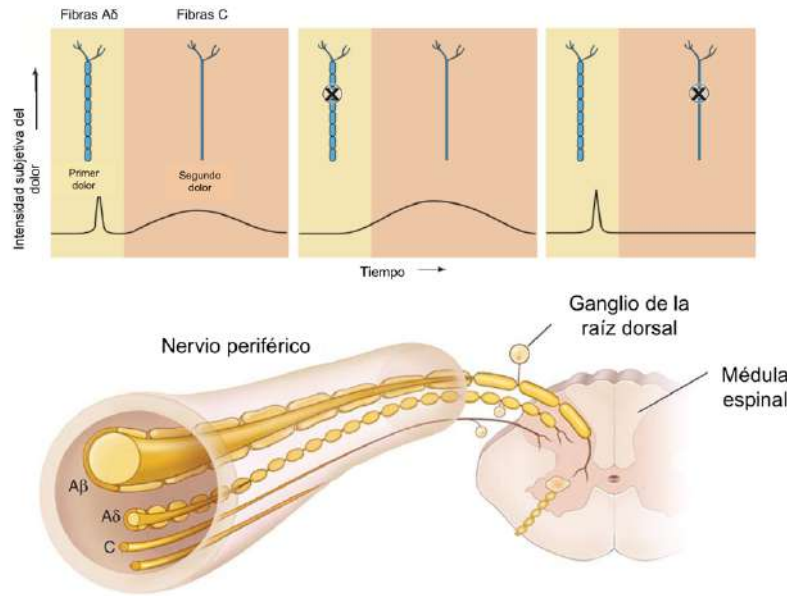


Figura 1: Esquema representando los tipos de fibras de las aferentes primarias

*Modificado de Kandel E. et al., (2013), Principles of neural science. McGraw-Hill, Estados Unidos

Se han descrito distintas sustancias endógenas inhibitorias de la nocicepción periférica. En general, estas sustancias desencadenan mecanismos para reducir la activación de los nociceptores y modular los procesos inflamatorios. Dentro de las sustancias antinociceptivas mejor estudiadas se encuentran los opioides (Stein y Lang, 2009) y los cannabinoides (Kress y Kuner, 2009). Los nervios expresan receptores para ambas sustancias y dicha expresión es modulada por la respuesta inflamatoria local y por el daño al tejido nervioso. Esto les confiere la capacidad de modular la nocicepción en condiciones de dolor inflamatorio y dolor neuropático (Stein, 2016; Kress y Kuner, 2009). Los ligandos endógenos pueden provenir de diferentes fuentes, por ejemplo distintas células del sistema inmune, queratinocitos y los mismos nociceptores pueden secretar estas moléculas para actuar de manera autocrina y paracrina. En este sentido y de importancia para el presente estudio es destacable que los queratinocitos y los fibroblastos tienen la capacidad de sintetizar y secretar OXT y pueden controlar la respuesta inflamatoria local en la piel (Deing et al., 2013). De hecho, tanto la OXT como la AVP pueden modular la respuesta inflamatoria a distintos niveles (Li et

al., 2017). Sin embargo, hasta el presente trabajo no se había descrito la presencia de OTR ni de V1aR en las terminaciones nerviosas periféricas.

3.2.2 Mecanismos de la nocicepción central

Como se mencionó anteriormente las proyecciones centrales de las neuronas aferentes primarias terminan en las astas dorsales de la médula espinal. En este sitio se lleva a cabo el relevo de información de las neuronas de primer orden a las de segundo orden. Estas últimas pueden ser de distintos tipos incluyendo neuronas de proyección e interneuronas locales. Las neuronas de segundo orden también se clasifican por el tipo de estímulo al que responden, las hay específicas a estímulos mecánicos no nocivos (mecanoceptores), a estímulos nocivos (nociceptivas específicas) y de amplio rango dinámico (ARD). Las últimas son de especial interés para el presente proyecto y se caracterizan por responder a estímulos inocuos y nocivos, es decir están inervadas por fibras A β , A δ y C.

Las astas dorsales de la médula espinal son un sitio importante en la modulación endógena del dolor debido a que representan el primer sitio de relevo de la información nociceptiva. Además de las aferencias de las neuronas de primer orden, a las astas dorsales llegan múltiples proyecciones axónicas descendentes provenientes de distintas regiones moduladoras del dolor, entre ellas el sistema sustancia gris periacueductal-médula rostroventromedial, núcleos del rafe, el *locus coeruleus* y el hipotálamo (Millán, 2002).

La información nociceptiva se transmite desde la médula espinal a sitios supraespinales a través de seis tractos principales: (1) espinotalámico, (2) espinoreticular, (3) espinomesencefálico, (4) cervicotalámico, (5) espinohipotálamico y (6) espinoparabraquial (Basbaum et al., 2009). Las

neuronas de tercer orden se encuentran en distintas regiones tanto cerebrales como del tronco encefálico. Las ubicadas en el tálamo tienen eferencias que llegan a múltiples áreas de la corteza cerebral que en conjunto codifican las distintas dimensiones sensitivas y emocionales del dolor. Mientras que las ubicadas en el tallo cerebral y diencefalo se encargan principalmente de codificar respuestas autonómicas y de iniciar la modulación endógena descendente (Millán, 2002).

3.3 Introducción a las funciones antinociceptivas de la oxitocina y la vasopresina

3.3.1 Acciones centrales antinociceptivas de la oxitocina

Previamente se mencionó que el hipotálamo puede modular la transmisión de la información nociceptiva a nivel de la médula espinal (Millán, 2002). Se conoce desde finales de la década de 1970 que existe una vía descendente oxitocinérgica que nace en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y se extiende hacia las astas dorsales medulares de manera ipsilateral (Buijs, 1978; Swanson y McKellar, 1979; Sawchenko y Swanson, 1982; Rousselot et al., 1990; Condés-Lara et al., 2007). Las terminaciones de estos axones se localizan en áreas en donde se encuentran receptores de la OXT (Moreno-López et al., 2013). Distintos estudios demostraron que esta vía tiene un papel importante en la nocicepción; por ejemplo, las neuronas oxitocinérgicas del NPV incrementan su actividad cuando se aplica un estímulo nociceptivo periférico al animal de experimentación (Wang et al., 2009; Condés-Lara et al., 2009; Matsuura et al., 2016). De hecho, la estimulación eléctrica del NPV produce un incremento de OXT tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo y médula espinal (Martínez-Lorenzana et al., 2008) y múltiples trabajos han comprobado que tanto la estimulación eléctrica como optogénica del NPV producen antinocicepción y analgesia en modelos de dolor agudo y crónico a través de la liberación

de OXT a nivel espinal (Condés-Lara et al., 2006; 2008; Miranda-Cardenas et al., 2006; Martínez-Lorenzana et al., 2008; Rojas-Piloni et al., 2008; DeLaTorre et al., 2009; Eliava et al., 2016). Adicionalmente, el NPV interactúa a nivel supraespinal con otros centros moduladores descendentes. En este sentido, la estimulación eléctrica del NPV aumenta la expresión de c-Fos en la sustancia gris periacueductal, rafe magno y *locus coeruleus* (Condés-Lara et al., 2015). Conexiones que parecen funcionales pues la administración de OXT en la sustancia gris periacueductal produce antinocicepción a estímulos térmicos y mecánicos (Ge et al., 2002) y tanto la lesión del rafe magno (Condés-Lara et al., 2012) como del *locus coeruleus* (Rojas-Piloni et al., 2012) disminuyen el efecto antinociceptivo de la estimulación eléctrica del NPV.

El potencial analgésico de la administración de OXT exógena por múltiples vías también se ha probado. La administración intracisternal, intratecal y espinal de OXT produce antinocicepción y analgesia en distintos modelos experimentales de dolor (Caldwell et al., 1987; Yang, 1994; Condés-Lara et al., 2005). Los mecanismos a nivel espinal aún se investigan, sin embargo múltiples hallazgos han comenzado a esclarecer cómo actúa la OXT a este nivel para producir antinocicepción. La microinyección de OXT en las astas dorsales puede inhibir o excitar distintas poblaciones celulares, a pesar de eso cuando se coadministra con glutamato en la mayoría de las ocasiones disminuye la activación mediada por este neurotransmisor (Condés-Lara et al., 2003). Además se demostró que la OXT puede reducir la actividad de neuronas de segundo orden evocada por fibras A δ y C de las neuronas aferentes primarias (Condés-Lara et al., 2005; Rojas-Piloni et al., 2010). Por lo que se postuló que una posibilidad es que la OXT active a interneuronas GABAérgicas que a su vez disminuyan de manera presináptica la actividad de las neuronas aferentes primarias (Rojas-Piloni et al., 2007; Breton et al., 2008; Condés-Lara et al., 2009; Jiang et al., 2014). El GABA no es el único neurotransmisor implicado, la participación de mecanismos

opioidegicos (Gao & Yu, 2004; Condés-Lara et al., 2009) y serotoninérgicos (Godínez-Chaparro et al., 2016) también se ha descrito en la analgesia mediada por OXT.

3.3.2 Acciones centrales antinociceptivas de la vasopresina

Si bien los núcleos que sintetizan y secretan a la AVP son los mismos que a la OXT y las proyecciones espinales del NPV pueden ser vasopresinérgicas (Buijs, 1978) el papel de la AVP en la antinocicepción parece ser diferente al de la OXT. Por ejemplo, la estimulación eléctrica del NPV produce antinocicepción en ratas de cepa Brattleboro, caracterizadas por carecer de la capacidad para sintetizar AVP (Yirmiya et al., 1990) apuntando a otras sustancias como las mediadoras antinociceptivas; sin embargo, la microinyección de AVP en la sustancia gris periacueductal (Yang et al., 2006a), en el núcleo caudado (Yang et al., 2006b) y en el núcleo del rafe magno (Yang et al., 2006c) produce antinocicepción. En este sentido, la estimulación nociceptiva periférica aumenta la expresión de AVP en los núcleos antes mencionados. Estos datos sugieren la posibilidad de que la AVP actúe a nivel supraespinal independientemente de la actividad del NPV.

Farmacológicamente se mostró que la administración intracerebroventricular e intratecal de AVP o análogos produce antinocicepción en distintos modelos de dolor agudo (Bernston y Berson, 1980; Kordower et al., 1982; Kordower y Bodnar, 1984. Bodnar et al., 1984, 1985; Watkins et al., 1986; Caldwell et al., 1987). Sin embargo, existen datos contradictorios sobre el efecto antinociceptivo a nivel espinal. En un modelo *in vivo* de nocicepción en ratas estudiado mediante electrofisiología, la microadministración de AVP no produjo antinocicepción en las astas dorsales de la médula espinal (Rojas-Piloni et al., 2010). Por otra parte, en ratones en libre movimiento la

administración espinal de AVP produce antinocicepción en el modelo de formalina, efecto dependiente del GABA (Peng et al., 2015). Es posible que la discrepancia de los datos se deba a una variación entre las especies. Finalmente, los mecanismos de acción de la antinocicepción inducida por AVP han sido menos estudiados que los de la OXT. Únicamente el reporte de Peng y colaboradores (2015) apunta a que posiblemente los canales GABA_A tengan un papel en los efectos espinales de la AVP, mientras que los efectos supraespinales fueron reportados únicamente de manera descriptiva.

3.3.3 Antecedentes de la modulación periférica antinociceptiva de la oxitocina

Cronológicamente los primeros reportes sobre el posible efecto periférico antinociceptivo de la administración de OXT datan de los primeros años de la década de 1990. En un reporte breve Uvnäs-Moberg y colaboradores (1992) describieron que la administración intraperitoneal (i.p.) de OXT en ratas, aumenta el tiempo de latencia en el modelo de nocicepción térmica de retirada de la cola (*tail flick test*), mientras que la administración de un antagonista del OTR disminuye el tiempo de latencia (Uvnäs-Moberg et al., 1992). Posteriormente se describió que la administración i.p. de OXT también produce antinocicepción en la prueba de nocicepción térmica de la placa caliente (*hot plate test*), en este reporte el efecto antinociceptivo fue máximo a los 30 minutos de la administración de la hormona y tuvo una duración mayor de 90 minutos. También se investigó la participación de los OTR y de receptores a opioides, los resultados mostraron que tanto la administración del antagonista del OTR como de naltrexona, un antagonista no específico de receptores de opioides, redujeron el efecto antinociceptivo de la OXT (Arletti et al., 1993). Si bien en el reporte anterior se describió que la OXT no producía efectos adversos significativos posteriormente se publicó que la administración i.p. de dosis elevadas de OXT produce sedación,

disfunción locomotriz, vasoconstricción e hipertensión (Xu y Wiesenfeld-Hallin Z, 1994) y que dichos efectos podían estar relacionados con el aumento de latencia en el modelo de nocicepción. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que Arletti y colaboradores (1993) encontraron el efecto antinociceptivo usando dosis entre 11 y 93 μg , mientras que Xu y Wiesenfeld-Hallin administraron dosis mayores a 250 μg . Por otra parte, la antinocicepción inducida por la administración i.p. de OXT no se limita a modelos de nocicepción térmica, en ratones también se probó el efecto antinociceptivo en el modelo de formalina (Reeta, et al., 2006; Schorscher-Petcu, et al., 2010) y de nocicepción mecánica (Schorscher-Petcu, et al., 2010). La vía i.p. no ha sido la única utilizada, la administración intravenosa (i.v.) de concentraciones fisiológicas de OXT reduce la actividad evocada por fibras C en neuronas de amplio rango dinámico de las astas dorsales de la médula espinal, así como la respuesta de tipo *wind-up* (Juif y Poisbeau, 2013).

A pesar de estar descrito el posible efecto antinociceptivo de la OXT periférica, el sitio en el cual produce la antinocicepción se ha abordado poco. Hasta ahora la mayor parte de las investigaciones se han enfocado en el posible papel modulador de la OXT en los ganglios de la raíz dorsal. Moreno-López y colaboradores (2013) encontraron que el OTR se expresa en los cuerpos neuronales (no así en las proyecciones axónicas) de células de los ganglios de la raíz dorsal, de manera predominante en las neuronas no peptidérgicas (positivas a IB4) aunque también fue encontrado en menor proporción en neuronas peptidérgicas (positivas a CGRP) (Moreno-López et al., 2013). Funcionalmente se describió que en células disociadas de ganglios de la raíz dorsal el tratamiento con OXT inhibe la despolarización por KCl en neuronas sensibles a capsaicina (Hobo et al., 2012), las corrientes inducidas por ATP (Yang et al., 2002) y por acidificación del pH (Qiu et al., 2014a), ambas importantes partícipes de la nocicepción periférica. Finalmente, en cultivos de neuronas de ganglios de la raíz dorsal se encontró que la administración de OXT produce una disminución de

la excitabilidad neuronal, esta disminución se debe a un aumento de las corrientes rectificadoras de salida de K^+ (Gong et al., 2015). Las vías intracelulares involucradas en el efecto periférico de la OXT se han investigado poco.

Existe el debate de si el efecto periférico es mediado a través de la unión y activación a receptores de OXT (OTR) o de AVP (V1a) (sección 3.3.5). En línea general se encontró que la OXT produce un aumento en el calcio intracelular (Ayar et al., 2014; Gong et al., 2015) y que dicho aumento participa en la producción del efecto final de la OXT (Yang et al., 2002). Se ha propuesto la participación de distintas vías de señalización intracelular, por ejemplo, se reportó que la administración de un inhibidor específico de las proteínas Gq (Qiu et al., 2014a) y de la proteína quinasa C (Ayar et al., 2014) interfiere con el efecto *in vitro* de la OXT. Gong y colaboradores postularon que en los ganglios de la raíz dorsal la OXT, a través de la vía de las proteínas $G\alpha_q$ -fosfolipasa C, incrementa la actividad de la sintasa de óxido nítrico, aumenta el GMP cíclico y finalmente incrementa la actividad de los canales rectificadores de K^+ , lo que disminuye así la excitabilidad neuronal (Gong et al., 2015).

Algunos hallazgos sugieren que la OXT periférica podría actuar de manera fisiológica como un modulador de la respuesta nociceptiva. En ratas, la estimulación eléctrica del nervio ciático en parámetros suficientes para activar fibras C y la estimulación sensitiva dolorosa aumentan la liberación de OXT en el torrente sanguíneo (Stock y Uvnäs-Moberg, 1988) y la administración de un antagonista al OTR disminuye el umbral basal en el modelo de retirada de la cola (*tail flick test*). Asimismo, la administración i.v. de OXT en concentraciones semejantes a las presentadas de manera fisiológica durante el trabajo de parto produce antinocicepción (Juif y Poisbeau, 2013). Además, la administración i.v. de un antagonista del OTR previene la antinocicepción producida

en el modelo de analgesia generada por estrés (Juif y Poisbeau, 2013) la cual es mediada por OXT (Robinson et al., 2002).

En resumen, la administración periférica de OXT por vía intravenosa e intraperitoneal produce antinocicepción. Hasta ahora los trabajos de investigación se han enfocado en el posible efecto a nivel de los ganglios de la raíz dorsal; sin embargo, la posible acción de la OXT también se podría presentar a nivel de las terminaciones nerviosas periféricas, cuestión que no se ha abordado hasta el presente estudio.

3.3.4 Antecedentes de la modulación periférica antinociceptiva de la vasopresina

Desde la década de los 1980 se describió que la administración periférica de AVP o un análogo produce antinocicepción en modelos de nocicepción térmica, química, mecánica e inflamatoria (Berkowitz y Sherman, 1982; Berson et al., 1983; Schorscher-Petcu et al., 2010; Mogil et al., 2011). A pesar de las múltiples descripciones del efecto antinociceptivo periférico de la AVP, se ha estudiado poco el posible sitio de acción en el cual actúa. Hasta este momento los ganglios de la raíz dorsal eran el sitio propuesto, debido a que la AVP aumenta las corrientes GABA_A a este nivel (Qiu et al., 2014b). Recientemente se sugirió que la AVP también podría actuar de manera periférica local, ya que la administración de AVP subcutánea (sc) produce antinocicepción en un modelo de dolor químico (Qiu et al., 2014a).

También se ha abordado el posible papel fisiológico antinociceptivo de la AVP. La cepa de ratas Brattleboro, caracterizada por la imposibilidad de secretar AVP, presenta hiperalgesia y disminución en la potencia antinociceptiva en el modelo de analgesia generada por estrés (Bodnar et al., 1982). Así mismo un modelo de liberación fisiológica de AVP inducida por la inyección de

una solución hiperosmótica produce antinocicepción en animales de experimentación (Baylis y Robertson, 1980). En este sentido, la aplicación de un estímulo nociceptivo produce un incremento en la AVP plasmática tanto en animales de experimentación (Suzuki et al., 2009) como en seres humanos (Kendler et al., 1977; Auböck y Konzett, 1983; Yang et al., 2012).

3.3.5 Receptores involucrados en la antinocicepción mediada por oxitocina y vasopresina

Hasta el momento existe debate sobre cuál es el receptor que utiliza la OXT y la AVP para producir antinocicepción y analgesia. En términos generales el consenso era que la OXT se une a su receptor OTR para producir antinocicepción, como lo demuestran distintos trabajos en los cuales se revirtió o se bloqueó el efecto antinociceptivo de la OXT con la administración de distintos antagonistas del OTR (Uvnäs-Moberg et al., 1992, 1993; Arletti et al., 1993; Yang, 1994; Robinson et al., 2002; Yang et al., 2002; Condés-Lara et al., 2006, 2008, 2009; Miranda-Cardenas et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2007, 2010); por el contrario se cree que la AVP a su vez utiliza el receptor V1a (Berkowitz y Sherman, 1982; Kordower y Bodnar, 1984) para producir antinocicepción. Sin embargo, un estudio publicado en el 2010 por Schorscher-Petcu y colaboradores (Schorscher-Petcu et al., 2010) comenzó el debate sobre el receptor utilizado por estos péptidos. En el citado estudio se describió que la administración sistémica de OXT en ratones *knock-out* (KO) al OTR continuaba produciendo analgesia en distintos modelos de dolor producido por estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Sin embargo, la analgesia mediada por la OXT no estaba presente en ratones KO al V1aR. Adicionalmente describieron que la analgesia mediada por OXT también podía ser revertida por un antagonista al V1a. A partir de ese año se publicaron tanto estudios que descartaron que la OXT utiliza el receptor V1a para producir analgesia (Juif y

Poisbeau, 2013; Jiang et al., 2014; García-Boll et al., 2018) como estudios que indican que el receptor V1a está implicado en las funciones antinociceptivas de la OXT (Qiu et al., 2014a; Kubo et al., 2017; Han et al., 2018). Solo un estudio propone que ambos receptores pueden estar involucrados al mismo tiempo en la función analgésica de la OXT (Hobo et al., 2012).

4. Planteamiento del problema y preguntas de investigación

Existen evidencias de que la administración intravenosa e intraperitoneal de los péptidos OXT y AVP produce antinocicepción en distintos modelos de dolor, lo que sugiere que ambas hormonas pueden modular la transmisión de la información nociceptiva a nivel periférico. Sin embargo, el sitio donde actúan en la periferia para producir antinocicepción se ha estudiado poco. Estudios señalan que la modulación antinociceptiva puede llevarse a cabo en los ganglios de la raíz dorsal en donde se expresan OTR y V1aR; no obstante, aún continúa un debate sobre cuál es el receptor utilizado por la OXT y la AVP para producir analgesia. Finalmente, no se ha abordado la hipótesis de que la OXT y la AVP actúen de manera local sobre las terminaciones nerviosas libres, pues no se ha reportado en la literatura la presencia de OTR o de V1aR en las mismas.

Tomando en cuenta lo anterior nos hicimos las siguientes preguntas de investigación.

- ¿La administración sc (periférica local) de OXT produce un efecto antinociceptivo local?
- ¿El OTR y el V1aR participan en el efecto antinociceptivo local de la administración sc de OXT?
- ¿La administración sc de AVP produce un efecto antinociceptivo local?
- ¿El OTR y el V1aR participan en el efecto antinociceptivo local de la administración sc de AVP?
- ¿Las terminaciones nerviosas periféricas de la piel expresan OTR y V1aR?
- ¿Qué tipo de fibras nerviosas periféricas expresan el OTR y V1aR?

5. Hipótesis

- La administración sc de OXT produce un efecto antinociceptivo en pruebas electrofisiológicas y conductuales. Este efecto está mediado principalmente a través de la unión de la OXT con el OTR. El V1aR no participa en los efectos antinociceptivos de la OXT.
- La administración sc de AVP produce un efecto antinociceptivo en pruebas electrofisiológicas y conductuales. Este efecto está mediado tanto por la unión de la AVP al V1aR como al OTR.
- Las terminaciones nerviosas periféricas de la piel expresan OTR y V1aR. Estos receptores son expresados por neuronas amielínicas de tipo peptidérgico.

6. Objetivos

- Objetivo 1: Determinar si la administración sc de OXT produce antinocicepción en un modelo electrofisiológico de nocicepción y en un modelo conductual de dolor.
- Objetivo 2: Determinar si el pretratamiento local con un antagonista específico del OTR o del V1aR bloquea los efectos de la administración sc de OXT.
- Objetivo 3: Determinar si la administración sc de AVP produce antinocicepción en un modelo electrofisiológico de nocicepción y en un modelo conductual de dolor.
- Objetivo 4: Determinar si el pretratamiento local con un antagonista específico del V1aR o del OTR bloquea los efectos de la administración sc de AVP.
- Objetivo 5: Determinar si las terminaciones nerviosas periféricas de la piel expresan OTR o V1aR mediante microscopía de fluorescencia.
- Objetivo 6: Determinar en qué tipo de fibras, peptidérgicas o no peptidérgicas, se expresan OTR o V1aR

7. Materiales y Métodos

7.1 Animales

Para el desarrollo del presente trabajo se llevaron a cabo experimentos electrofisiológicos, conductuales e histológicos con finalidades complementarias. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología y siguen los principios éticos de experimentación en animales de la Asociación Internacional para el Estudio y Tratamiento del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) y la NOM-062-ZOO-1999. Se usaron ratas Wistar macho entre 250g-300g (n = 208), en ciclo luz-obscuridad 12:12, con alimentación e hidratación *ad libitum*, en la **tabla 2** se realiza un resumen de los animales usados por técnica experimental y por grupo.

7.2 Compuestos

Los fármacos utilizados en el presente estudio fueron: [Arg⁸]-vasopresina de sal de acetato (AVP), oxitocina hidrato de sal de acetato (OXT), el antagonista del receptor de oxitocina (OTR) (2S)-2-Amino-N-[(1S,2S,4R)-7,7-dimetil-1-[[[4-(2-metilfenil)-1-piperazinil]sulfonil]metil]biciclo[2.2.1]hept-2-yl]-4-(metilsulfonil)butanamida (L368,899) y el antagonista del receptor a vasopresina (V1a) (2S)-1-[[[(2R,3S)-5-Cloro-3-(2-clorofenil)-1-[(3,4-dimetoxifenil)sulfonil]-2,3-dihidro-3-hidroxi-1H-indol-2-yl]carbonil]-2-pirrolidincarboxamida (SR49059). Todos los fármacos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. AVP y OXT se diluyeron en solución salina, mientras que L368,899 y SR49059 se diluyeron en DMSO 10% y fueron administrados por vía sc.

Electrofisiología	Grupo	Número de animales utilizados
	Control	6
	OXT 1 µg /pata	5
	OXT 10 µg /pata	7
	OXT 56 µg /pata	8
	OXT 56 µg /pata + L368,899 10µg /pata	5
	OXT 56 µg /pata + SR49059 10µg /pata	5
	AVP 0.1 µg /pata	6
	AVP 1 µg /pata	5
	AVP 10 µg /pata	6
	AVP 10 µg /pata contralateral	5
	AVP 10 µg /pata + SR49059 10µg /pata	5
	AVP 10 µg /pata + L368,899 10µg /pata	5
	L368,899 10µg /pata	5
	SR49059 10µg /pata	6
	Subtotal de animales usados	79
Formalina	Grupo	Número de animales utilizados
	OXT 0.1 µg /pata	8
	OXT 10 µg /pata	9
	OXT 31 µg /pata	8
	OXT 100 µg /pata	5
	OXT 100 µg /pata contralateral	6
	OXT 31 µg /pata + L368,899 10µg /pata	6
	OXT 31 µg /pata + SR49059 10µg /pata	6
	AVP 0.1 µg /pata	6
	AVP 1 µg /pata	6
	AVP 10 µg /pata	6
	AVP 10 µg /pata contralateral	5
	AVP 10 µg /pata + SR49059 10µg /pata	6
	AVP 10 µg /pata + L368,899 10µg /pata	9
	L368,899 10µg /pata	5
	SR49059 10µg /pata	7
	Subtotal de animales usados	98

Rotarod	Grupo	Número de animales utilizados
	1 grupo experimental	10
Western blot	Grupo	Número de animales utilizados
	Control	4
	Salina	4
	Formalina	4
Microscopía	Grupo	Número de animales utilizados
		9
Total de animales utilizados:		208 ratas

Tabla 2: Número de ratas utilizado por abordaje experimental y resumen de grupos.

7.3 Experimentos electrofisiológicos

7.3.1 Procedimiento quirúrgico

Durante el procedimiento quirúrgico los animales de experimentación se encontraron bajo anestesia general (sevoflurano 3% por vaporizador.), control de temperatura a 38°C por medio de un sistema circulante de agua, ventilación asistida (55 ventilaciones/min, 2/3 N₂O y 1/3 O₂) y monitorización capnográfica (Capstar-100 CO₂ analyzer; CWI Inc., Ardmore PA, USA). Los animales intervenidos fueron montados en un aparato estereotáxico y se les realizó una laminectomía, con exposición de los segmentos L4 y L5 de la médula espinal con retiro cuidadoso de las meninges. Para garantizar la estabilidad de los registros el aparato estereotáxico cuenta con un sistema de fijación espinal.

7.3.2 Registros electrofisiológicos

Se realizaron registros extracelulares unitarios de neuronas localizadas en las astas dorsales de la médula espinal usando electrodos de tungsteno (≈ 3 a $9 \text{ M}\Omega$). La actividad unitaria se amplificó ($\times 1000$), filtró (300Hz-3KHz), digitalizó y analizó usando el software Spike2 (*CED, Cambridge, UK*).

Se registraron neuronas con un campo receptivo periférico (CRP) en las patas posteriores de los animales de experimentación. El CRP se localizó mediante estimulación táctil de bajo umbral (golpeteo de la pata). Una vez localizado el CRP se insertaron dos electrodos subcutáneos de estimulación conectados a un estimulador Grass (Estimulador de Grass S11). Se dieron pulsos de intensidad creciente para determinar el umbral de activación de las fibras $A\delta$ y C (de alto umbral). Únicamente las células que respondieron tanto a la estimulación de bajo umbral como de alto umbral se incluyeron en el estudio, estas neuronas son clasificadas como de amplio rango dinámico (ARD).

Con la actividad digitalizada se construyeron histogramas peri-estímulos lo que permitió caracterizar la actividad evocada por cada tipo de fibra tomando en cuenta la latencia entre el estímulo del CRP y los potenciales de acción registrados. De esta forma se clasificó en actividad mediada por: fibras $A\beta$ (0–20 ms), fibras $A\delta$ (20–90 ms), fibras C (90–300 ms) y posdescarga (300–800 ms) (Urch y Dickenson, 2003) (**Fig. 2**).

7.3.3 Diseño experimental (electrofisiología)

Cada histograma peri-estímulo se construyó con las respuestas neuronales evocadas por una serie de veinte estímulos eléctricos del CRP (**Fig. 2 D**). Los estímulos fueron hechos con una

intensidad tres veces superior al umbral de activación de las fibras C, una duración de 1 milisegundo y una frecuencia de 0.5 Hz.

Para considerar una célula registrada como estable, la variación en la actividad evocada por cada tipo de fibra debía ser menor de +/- 10% a lo largo de cuatro series control de estimulación eléctrica del CRP, cada una de estas series separada por intervalos de cinco minutos.

Después de las cuatro series control, se realizó la administración sc en el CRP de OXT (1, 10 o 56µg /pata) o de AVP (0.1, 1 o 10 µg /pata), utilizándose solo una dosis para cada animal de experimentación. Se construyeron y evaluaron los histogramas peri-estímulo a los 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos posteriores a la aplicación del fármaco.

Para diferenciar entre los posibles efectos locales y sistémicos de la AVP en un grupo de ratas se administró AVP 10 µg sc en la pata contralateral a la que poseía el CRP.

Para investigar la participación de los receptores de OXT (OTR) y de AVP (V1aR) se administró sc el antagonista del OTR: L368,899 (10µg /pata) o del V1aR: SR49059 (10µg /pata) en el CRP, cinco minutos previos a la administración de OXT o de AVP. Posteriormente se realizó el protocolo antes mencionado.

7.3.4 Análisis de los datos obtenidos en los experimentos electrofisiológicos

El promedio de los potenciales de acción evocados por cada tipo de fibra durante las 4 series control fue considerado como el 100% de actividad. Después de administrar el fármaco (OXT o AVP) se promedió el número de potenciales de acción evocados por cada tipo de fibra a los 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos y se normalizaron los datos con respecto al control.

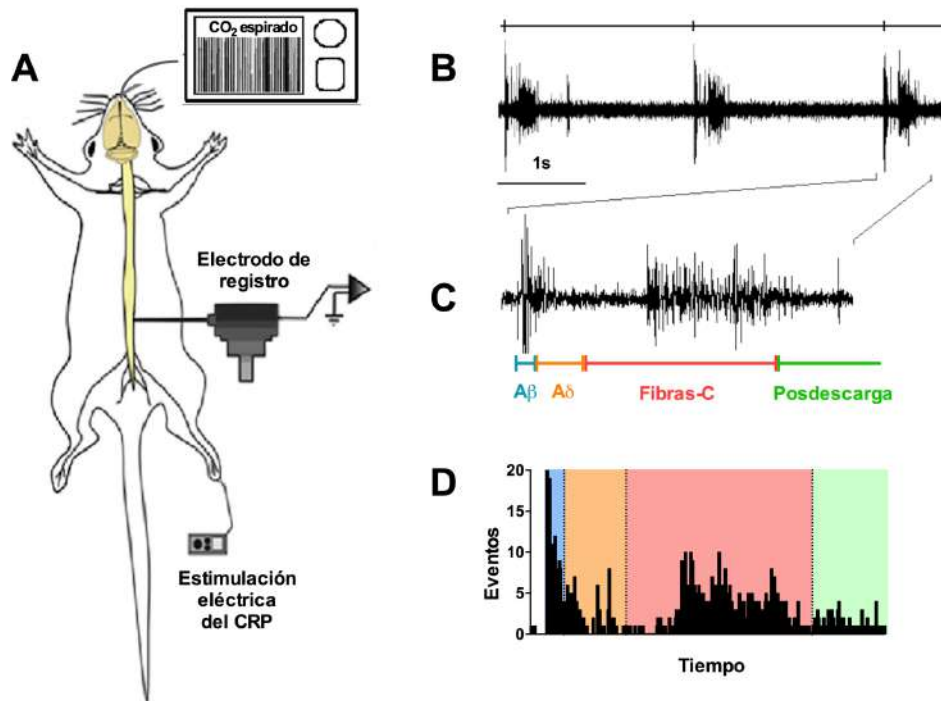


Figura 2. Esquema del diseño experimental. Registros unitarios extracelulares de respuestas a la estimulación eléctrica del campo receptivo periférico (CRP). **(A)** Imagen que representa el tipo de preparación experimental, se esquematiza el sitio de registro en la médula espinal lumbar, el sitio de estimulación del CRP y el registro capnográfico. **(B)** Se observan tres estimulaciones del CRP (trazo superior) y la respuesta de una neurona de amplio rango dinámico (trazo inferior). **(C)** Detalle de una respuesta a la estimulación CRP indicándose la actividad evocada correspondiente a cada tipo de fibra. **(D)** Muestra un histograma peri-estímulo construido con 20 respuestas a la estimulación del CRP.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con dos aproximaciones distintas. (1) Se evaluó el efecto de la OXT y de la AVP a través del tiempo del experimento mediante la prueba de ANOVA de dos vías y (2) se comparó el efecto global sobre la actividad evocada mediante la prueba de ANOVA de una vía. La comparación de medias se realizó entre el grupo control y los grupos farmacológicos con o sin antagonista. Para cuantificar el efecto global se calculó el área bajo la curva (ABC) de la respuesta neuronal y el promedio de potenciales de acción a lo largo de todo el experimento.

Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media. Para el análisis estadístico utilizamos el software GraphPad Prism® V 6.01 (La Jolla, CA, USA). Comprobamos la

distribución normal de los datos con el test de Shapiro-Wilk y posteriormente se realizó la prueba de ANOVA correspondiente. Utilizamos la prueba *post hoc* de Dunnett para comparar los grupos tratados contra el grupo control; en los análisis que requirieron de múltiples comparaciones utilizamos la prueba *post hoc* de Tukey (indicado en los pies de figura). Consideramos un valor de probabilidad de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El número de animales usados en cada experimento está reportado en la sección de resultados.

7.4 Experimentos conductuales

7.4.1 Modelo de dolor agudo inducido por formalina

Todos los animales pasaron por un periodo de habituación en una cámara de observación por un período de treinta minutos durante tres días consecutivos. El día de experimentación fueron inicialmente colocados durante treinta minutos en la cámara de observación y posteriormente se administró la formalina (50 μ l sc, 1%) en la pata posterior derecha. En estas condiciones experimentales se llevó a cabo la medición de la conducta nociceptiva, manifestada como sacudidas de la pata inyectada (*flinches/shakes*) (Wheeler-Aceto et al., 1990); las sacudidas se cuantificaron en periodos de un minuto cada cinco minutos hasta completar sesenta minutos a partir de la administración de la formalina. Esta temporalidad se utilizó con la finalidad de estudiar las tres fases del modelo de formalina: fase 1 (0:10 min), interfase (10:20 min) y fase 2 (20:60 min) (Tjølsen et al., 1992).

En los grupos experimentales se administró OXT (0.1, 10, 31, 100 μ g /pata) o AVP (0.1, 1, 10 μ g /pata) sc en el dorso de la pata posterior derecha cinco minutos previos a la administración de formalina y se continuó con el proceso anteriormente descrito. Para discernir entre un efecto local

o uno sistémico se realizaron grupos con administración de OXT (100 µg/pata) o de AVP (10 µg/pata) sc en el dorso de la pata posterior izquierda (contralateral a la aplicación de formalina).

Con la finalidad de estudiar el receptor involucrado en los efectos de la OXT y AVP se administró sc ipsilateralmente el antagonista del OTR (L368,899-100 µg/pata) o el antagonista al V1aR (SR49059-10 µg/pata) cinco minutos previos a la administración de OXT (31µg/pata) o de AVP (10 µg/pata) y posteriormente se continuó con el procedimiento anteriormente descrito.

7.4.1.1 Análisis de los datos obtenidos con el modelo de formalina

Se valoraron las áreas bajo la curva (ABC) de la fase 1, interfase y fase 2 para cada situación experimental. Realizamos la comparación de medias entre los distintos grupos mediante un test de ANOVA de una vía y posteriormente aplicamos el análisis post hoc de Dunnett; en los análisis que requirieron de múltiples comparaciones utilizamos la prueba post hoc de Tukey (indicado en los pies de figura). Consideramos los datos estadísticamente significativos a partir de una $p < 0.05$.

7.4.2 Modelo de coordinación motora con *Rotarod*

Con la intención de evaluar la coordinación motora utilizamos la prueba de coordinación motriz con un equipo *Rotarod* (Cartmell et al., 1991); este modelo consiste en colocar a los animales de experimentación en un cilindro giratorio motorizado. Entrenamos a las ratas en el *Rotarod* por tres días (2 sesiones/día). Cada sesión de entrenamiento consistía en tres ciclos de locomoción con duración de 180 segundos a una velocidad de 15 revoluciones por minuto (diámetro del cilindro de 9.52 cm). Después del entrenamiento se realizaron las sesiones experimentales durante dos semanas. Cada sesión experimental consistía en la administración sc en la pata posterior derecha de solución salina (grupo control) o del fármaco: OXT (100 µg/pata)

o AVP (10 µg/pata) 10 minutos previos a colocar la rata en el cilindro; a continuación, se evaluó el tiempo que permanecía el animal sobre el *Rotarod* durante los tres ciclos de cada sesión. Para cada rata, entre la administración de fármacos, transcurrieron más de veinticuatro horas.

7.4.2.1 Análisis de los datos obtenidos con el modelo de Rotarod

Para el análisis estadístico realizamos comparaciones de medias entre los distintos grupos usando el test de ANOVA de una vía y posteriormente aplicamos el análisis *post hoc* de Dunnett, consideramos estadísticamente significativos los datos con una $p < 0.05$.

7.5 Western blot

Para indicar la presencia de los OTR en nervios periféricos realizamos la técnica de *Western blot*. Utilizamos 12 ratas (250 g) que dividimos en 3 grupos con $n=4$: (1) grupo control; (2) administración sc de solución salina (50 µl/ pata) y (3) inyección sc de formalina 1% (50 µl/ pata). Después de 1 día de la administración del compuesto según el grupo se sacrificaron los animales por decapitación. Mediante disección expusimos el nervio ciático izquierdo (ipsilateral al sitio de administración del compuesto), removimos el tejido conectivo y obtuvimos una porción de ≈ 2 cm de longitud. Congelamos y almacenamos a -70 °C estos fragmentos del nervio.

El tejido se homogenizó mediante agitación en solución fría hipotónica buffer Tris-HCl (Tris 50 mM, pH 9) la cual contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche Mannheim, Alemania) y 0.5 mM de fluoruro de metilfenilsulfonilo (Sigma St. Louis, MO). Centrifugamos los homogenizados a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C, posteriormente recolectamos los sobrenadantes y cuantificamos la proteína con el método de Bradford (1976). Al sobrenadante se le agregó buffer Laemmli (1970) y posteriormente para 30 µg de cada muestra utilizamos el

protocolo SDS-PAGE con geles de poliacrilamida al 12% en un equipo Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, Hercules, CA). Las muestras se corrieron bajo condiciones reductoras (en presencia de 2-mercaptoetanol al 5%) y con un voltaje constante (100 V en el gel de apilamiento; 150 V en el gel de resolución). Usamos marcadores de peso molecular premarcados (Bio-Rad) para estimar el peso molecular de las muestras. Después de la electroforesis los bloques se equilibraron en buffer de transferencia frío (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol v/v, pH 8.3) por 30 minutos y electrotransferidos (200 mA por 1hr) (Towbin et al., 1979) a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Después de la transferencia lavamos las membranas con 30mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5 (TBS) por 10 min y después bloqueamos con leche deshidratada al 5% (Bio-Rad) en TBS por 2 hrs. Después de lavar las membranas 3 veces las incubamos a temperatura ambiente en una mezcla de TBS con tween 20 (TTBS) con el anticuerpo anti-OTR (desarrollado en cabra, dilución 1:500, Cat.no. sc-8103, Santa Cruz Biotechnology Inc., C). Posteriormente, lavamos las membranas 3 veces (10 minutos cada vez) en TTBS y fueron incubadas por 2 hrs a 4 °C con el anticuerpo secundario (conejo anti-cabra IgG-HRP, diluido 1:3000; Cat.no. 81-1620, Invitrogen™). La detección de señales proteicas se consiguió al incubar las membranas en el agente para quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) por 5 minutos y expuestas a una película fotográfica Kodak BioMax ML. El día siguiente incubamos los blots durante la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-GAPDH (desarrollado en conejo, diluido 1:1000; Cat.no. 2118, Cell Signaling Technology; GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), posteriormente las lavamos 3 veces con TTBS e incubamos por 2 horas con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo IgG-HRP, diluido 1:3000; Cat.no. 65-6120, Invitrogen™). Usamos el anti-GAPDH como un control interno para normalizar la expresión de la proteína del OTR. En ambos casos escaneamos los inmunoblots y analizamos

las bandas de manera semicuantitativa con el software Image Lab (v5.2.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

7.6 Histología

7.6.1 Inmunofluorescencia de las fibras aferentes primarias

Usamos 9 ratas que fueron decapitadas e inmediatamente después obtuvimos el tejido cutáneo mediante la escisión de la piel pilosa de la parte lateral de la pata del animal de experimentación. Congelamos el tejido en el medio de montaje Tissue-Tek® (Sakura Finetek USA, Inc.), posteriormente lo colocamos en isopentano de nitrógeno líquido y lo almacenamos a una temperatura de -80°C.

Para la búsqueda del OTR en piel, seccionamos el tejido con el uso de un criostato en cortes de 50 µm de grosor y posteriormente lo fijamos en paraformaldehído 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar el tejido en buffer fosfato 0.1 M realizamos la primera incubación (24 hrs, temperatura 4°C) en un cóctel con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-OTR (desarrollado en cabra, dilución 1:400, policlonal; Cat.no. sc-8103, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), anticuerpo anti-CGRP (desarrollado en conejo, dilución 1:2000, policlonal; Cat.no. AB15360, Chemicon International, Temecula CA). Posteriormente lavamos los cortes en buffer fosfato 0.1 M y los incubamos con el anticuerpo secundario apropiado (24 hrs, temperatura 4°C). Los anticuerpos secundarios que utilizamos fueron: anticuerpo anti-cabra desarrollado en burro (Alexa Fluor® 488, Cat.no. A-11055, Invitrogen™), anticuerpo anti-conejo desarrollado en burro (Alexa Fluor® 647, Cat.no. A-31573, Invitrogen™). Para detectar la isolectina B4 (IB4) se utilizamos GS-IB4 (Alexa Fluor® 568, I21412, Invitrogen™) durante la incubación secundaria.

Además, realizamos un grupo control (n=3) en el que únicamente llevamos a cabo la incubación con los anticuerpos secundarios.

Para la búsqueda de V1a en piel el tejido seccionamos con el uso de un criostato en cortes de 20 μm de grosor y realizamos la fijación. Hicimos la primera incubación en un cóctel con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-V1a (desarrollado en conejo, dilución 1:300, Cat.no. A53272, Epigentek Group Inc., USA) y anticuerpo anti-OTR (desarrollado en cabra, dilución 1:400, policlonal; Cat.no. sc-8103, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA). Después del lavado durante la incubación secundaria utilizamos el anticuerpo anti-cabra desarrollado en burro (Alexa Fluor® 488, Cat.no. A-11055, Invitrogen™) y el anticuerpo anti-conejo desarrollado en burro (Alexa Fluor® 555, Cat.no. A-31572, Invitrogen™). También realizamos un grupo control únicamente con la incubación con los anticuerpos secundarios.

7.6.2 Microscopía confocal y análisis de imágenes

Observamos los cortes en un microscopio confocal LSM 510 o LSM 780 (Zeiss, México) con objetivos de inmersión 25x/0.8 40x/1.3 y 63x/1.32. Excitamos el Alexa Fluor 488 mediante un láser de argón (488 nm), el Alexa Fluor 555 y 568 con un láser diodo (561 nm) y el Alexa Fluor 647 con un láser de helio/neón (633 nm). Mantuvimos el pinhole y los intervalos de corte en Z constantes en todas las imágenes. Obtuvimos entre 40 y 100 cortes en Z de 0.5-1 μm de grosor de cada tejido.

Adquirimos cada imagen a un tamaño de 1024 x 1024 píxeles. Y la analizamos usando el programa ZEN 1 *Blue edition* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemania). En el presente trabajo reportamos secciones simples, proyecciones en Z y ortogonales.

8. Resultados

8.1 Experimentos electrofisiológicos

8.1.1 Efecto de la administración periférica de oxitocina sobre la actividad evocada en neuronas de amplio rango dinámico

Este grupo de experimentos tuvo por objetivo estudiar si la administración sc de OXT produce antinocicepción periférica de tipo local. Encontramos que la administración sc de OXT-1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ($n=5$) no modificó de forma significativa la activación neuronal inducida por fibras $A\beta$, $A\delta$, C ni la posdescarga a lo largo de la prueba de 60 min. de duración. Las dosis de $10 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ($n=7$) y de $56 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ($n=8$) redujeron la actividad global mediada por fibras a $A\delta$ y C, sin afectar la actividad evocada por fibras $A\beta$ (**Fig. 3 F, J, G, K**), debido al tipo de información que transportan este tipo de fibras este resultado indica un efecto antinociceptivo. Por otra parte, únicamente la dosis de $56 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ redujo la posdescarga (**Fig. 3 D**). Una prueba ANOVA de 2 vías mostró que la reducción de la actividad mediada por fibras C se mantuvo durante todo el experimento excepto a los 50 min (**Fig. 3 C**). Es interesante señalar que se puede observar mediante una regresión lineal la relación de dosis respuesta en la disminución de la actividad producida por las dosis de 1 10 y $56 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ en la actividad evocada por fibras $A\delta$, C y posdescarga (**Fig. 3 F, G y H**).

8.1.2 Participación del receptor de oxitocina en el efecto de la administración de oxitocina

Estudiamos la participación de los OTR en el efecto antinociceptivo de la OXT. En esta serie de experimentos utilizamos la dosis de OXT con mayor efecto antinociceptivo ($56 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$).

El pretratamiento con el antagonista L368,899-10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (L3) administrado *sc*, cinco minutos previos a la administración de OXT-56 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (n=5), provocó un bloqueo parcial del efecto de la OXT sobre la actividad mediada por las fibras A δ y C y la posdescarga (**Fig. 4**). Una prueba ANOVA de 2 vías mostró que el bloqueo por el L3 del efecto de la OXT sobre la actividad mediada por fibras C se mantuvo durante todo el experimento excepto al minuto 5 (**Fig. 4 C**). Resulta interesante señalar que la administración del antagonista no provocó cambios *per se* (n=5) en la actividad mediada por los distintos tipos de fibras ni en la posdescarga (**Fig. 4**).

8.1.3 Participación del receptor de vasopresina V1a en el efecto de la administración de oxitocina

Posteriormente abordamos si el V1aR también podría estar participando en el efecto antinociceptivo de la OXT. En este grupo de experimentos se utilizó la dosis de OXT con mayor efecto antinociceptivo (56 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$). El pretratamiento con el antagonista SR49059-10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (SR) administrado *sc*, cinco minutos previos a la administración de OXT-56 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (n=5), provocó la reversión parcial del efecto de la OXT sobre la actividad mediada por las fibras A δ y C y la reversión completa del efecto sobre la posdescarga (**Fig. 5**). Si bien la prueba ANOVA de 2 vías no mostró que el bloqueo mediado por el SR del efecto de la OXT sobre la actividad mediada por fibras C se mantuvo durante todo el experimento, es visible que el bloqueo fue menor en los primeros 20 minutos del experimento (**Fig. 5 C**). Por último, la administración del antagonista no provocó cambios *per se* (n=6) en la actividad mediada por los distintos tipos de fibras ni en la posdescarga (**Fig. 5**).

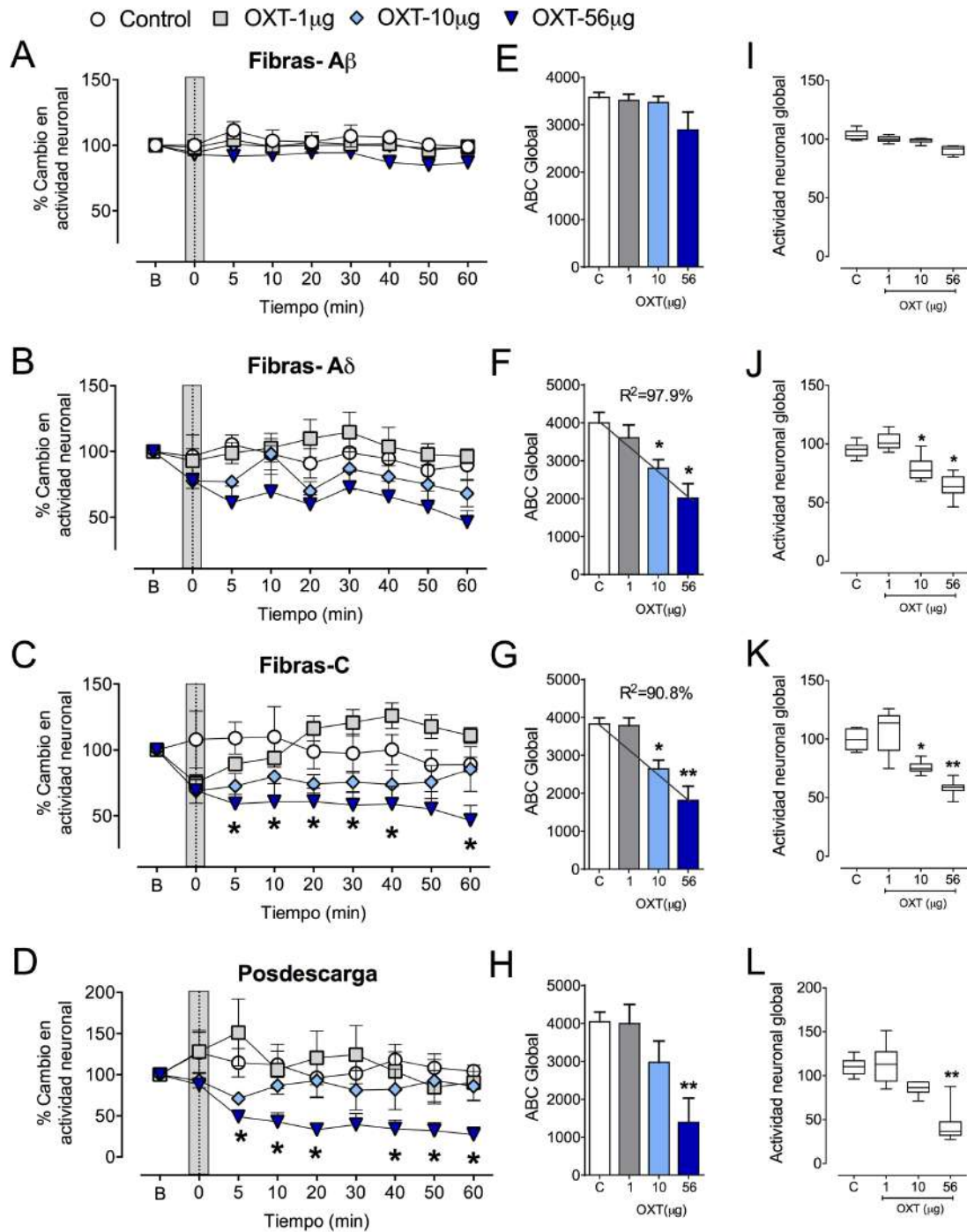


Figura 3. Gráficas que muestran los efectos de la administración sc de OXT en el CRP sobre la actividad de neuronas ARD en médula espinal. (A, B, C, D) Muestran el curso temporal de la actividad normalizada durante 60 minutos posteriores a la administración de OXT (línea punteada) para cada tipo de fibra. $*=p<0.05$, ANOVA 2 vías (control contra OXT 56μg). (E, F, G, H) Representan el área bajo la curva (ABC) construida con el curso temporal de la respuesta durante los 60 minutos posteriores a la administración del fármaco, se realizó un análisis de regresión lineal y se muestran los que resultaron significativos con sus respectivas R cuadradas (R^2). (I, J, K, L) Muestran la distribución de los datos obtenidos, media (percentiles 95 y 5, valores mínimos y máximos). Diferencia significativa $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Dunnett.

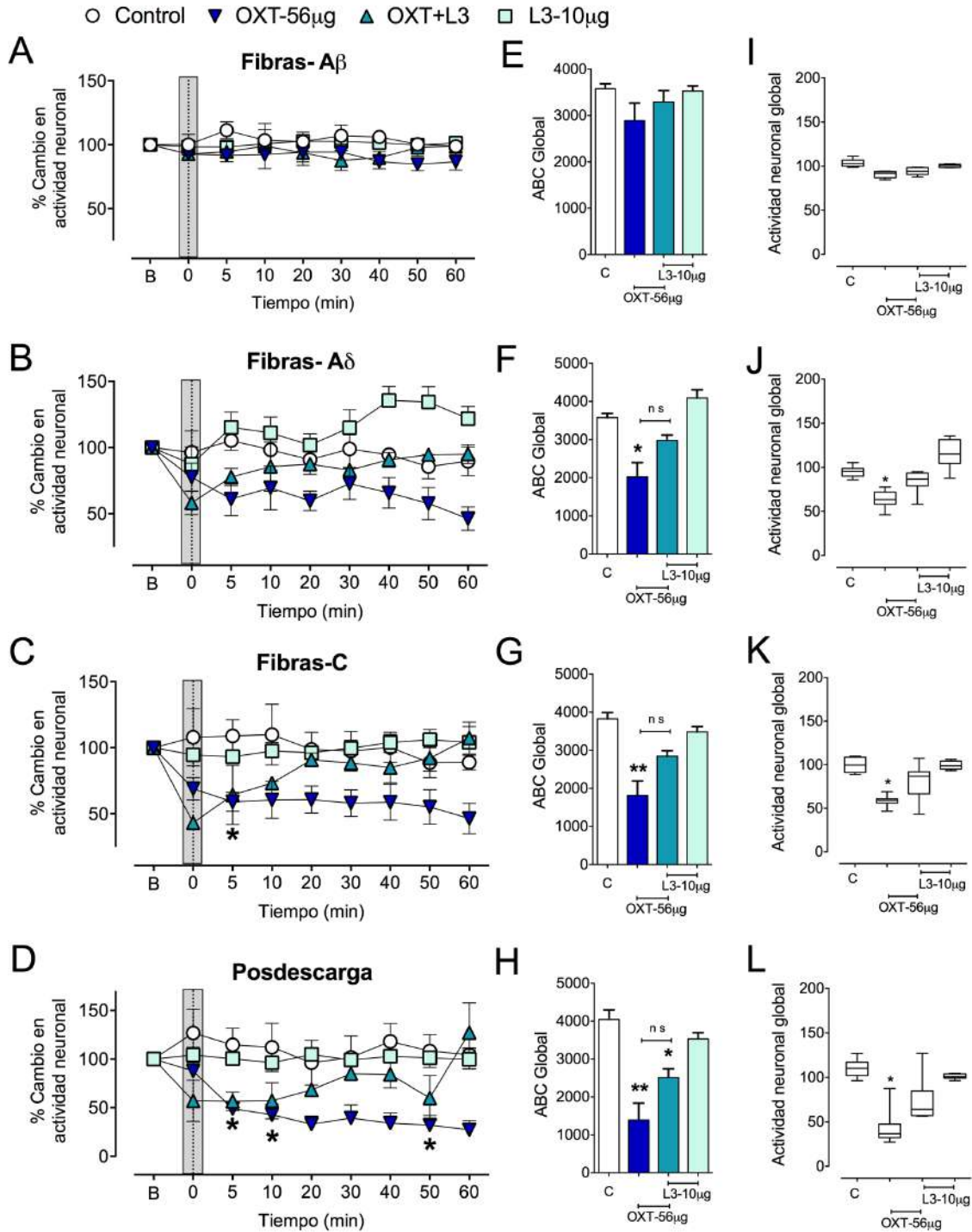


Figura 4. Gráficas que muestran los efectos del pretratamiento con el antagonista del OTR L368,899 (L3) sobre la acción de la OXT. (A, B, C, D) Muestran el curso temporal de la actividad normalizada durante 60 minutos posteriores al pretratamiento con el antagonista (B) y a la administración de OXT (línea punteada) para cada tipo de fibra, * $p < 0.05$, ANOVA 2 vías (control contra OXT+L3). (E, F, G, H) Representan el área bajo la curva (ABC) construida con el curso temporal de la respuesta durante los 60 minutos posteriores a la administración del fármaco. (I, J, K, L) Muestran la distribución de los datos obtenidos, media (percentiles 95 y 5, valores mínimos y máximos). Diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

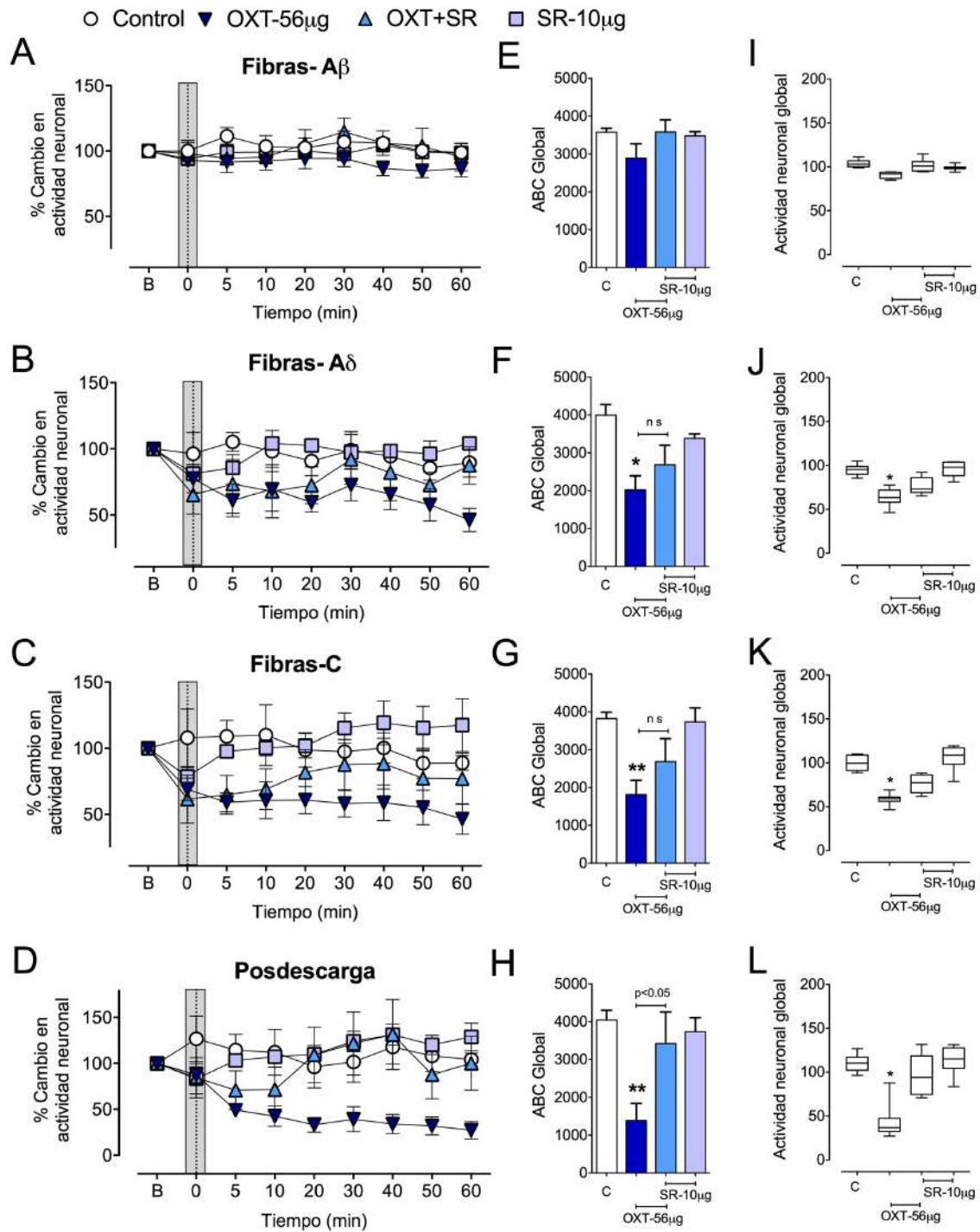


Figura 5. Gráficas que muestran los efectos del pretratamiento con el antagonista del V1aR SR49059 (SR) sobre la acción de la OXT. **(A, B, C, D)** Muestran el curso temporal de la actividad normalizada durante 60 minutos posteriores al pretratamiento con el antagonista (B) y a la administración de OXT (línea punteada) para cada tipo de fibra. **(E, F, G, H)** Representan el área bajo la curva (ABC) construida con el curso temporal de la respuesta durante los 60 minutos posteriores a la administración del fármaco. **(I, J, K, L)** Muestran la distribución de los datos obtenidos, media (percentiles 95 y 5, valores mínimos y máximos). Diferencia significativa *= p <0.05, **= p <0.01, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

8.1.4 Efecto de la administración periférica de vasopresina sobre la actividad evocada de neuronas de amplio rango dinámico

Los registros electrofisiológicos de la actividad neuronal en la médula espinal mostraron que la dosis más baja de AVP-0.1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (n=6) no provocó cambios en la actividad evocada por las fibras A β , A δ , C ni en la posdescarga (**Fig. 6**). La dosis intermedia de AVP 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (n=5) no afectó a la actividad mediada por fibras A β (**Fig. 6 A, E, I**). Sin embargo, esta dosis produjo una reducción en la actividad global mediada por las fibras A δ (**Fig. 6 F, J**) y una reducción no significativa en la actividad mediada por las fibras C (**Fig. 6 G, K**).

La dosis más alta de AVP-10 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ (n=6) no afectó la actividad mediada por fibras A β (**Fig. 6 A, E, I**) pero produjo una reducción en la actividad global mediada por las fibras A δ (**Fig. 6 B, F, J**) y C (**Fig. 6 C, G, K**) Además, esta dosis produjo una disminución en la posdescarga global (**Fig. 6 H, L**). Se encontró una dosis respuesta en el efecto sobre las fibras A δ y C (**Fig. 6 F, G**). La administración de la dosis más alta AVP-10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (n=5) en la pata contralateral a la estimulada eléctricamente no redujo la actividad mediada por A β , A δ y C (**Fig. 6 F, G**).

Una prueba de ANOVA de dos vías mostró una disminución significativa en la actividad mediada por fibras A δ a lo largo de todo el experimento, excepto en el minuto 20 después de ser administrada la AVP. Y una reducción significativa en la actividad mediada por fibras C a partir del minuto 20 (**Fig. 6 B,C**). Adicionalmente, la disminución en la posdescarga se presentó con un efecto máximo entre 30 y 40 minutos de la administración de la AVP (**Fig. 6 D**).

8.1.5 Participación del receptor de vasopresina V1a en el efecto de la administración de vasopresina

En este grupo de experimentos se utilizó la dosis de AVP con mayor efecto antinociceptivo (10 µg/50 µl). El pretratamiento local con el antagonista del V1aR SR49059 (10 µg/50 µl, n=5) (SR) bloqueó completamente el efecto de la AVP (10 µg/50 µl) sobre la actividad global evocada por fibras Aδ y C y en la posdescarga (**Fig. 7 F, J, G, K**). La prueba ANOVA de dos vías mostró que el bloqueo del efecto antinociceptivo de la AVP se presentó durante todo el experimento (**Fig. 7 B, C, D**). La administración del SR-10 µg/50 µl (n=5) no provocó cambios per se en la actividad mediada por los distintos tipos de fibras ni en la posdescarga (**Fig. 7**).

8.1.6 Participación del receptor de oxitocina en el efecto de la administración de vasopresina

En otro grupo de ratas, el pretratamiento local con el antagonista del OTR L368,899-10 µg/50 µl (L3) bloqueó parcialmente el efecto de la AVP-10 µg/50 µl (n=5) sobre la actividad global evocada por fibras Aδ y C (**Fig. 8 F, J, G, K**) y completamente la posdescarga (**Fig. 8 H, L**). La prueba de ANOVA de dos vías probó que el efecto se mantuvo a lo largo de todo el experimento, excepto en el minuto 60 para las fibras Aδ (**Fig. 8 B, C, D**). La administración del L3 no provocó cambios per se (10 µg/50 µl, n=5) en la actividad mediada por los distintos tipos de fibras ni en la posdescarga (**Fig. 8**).

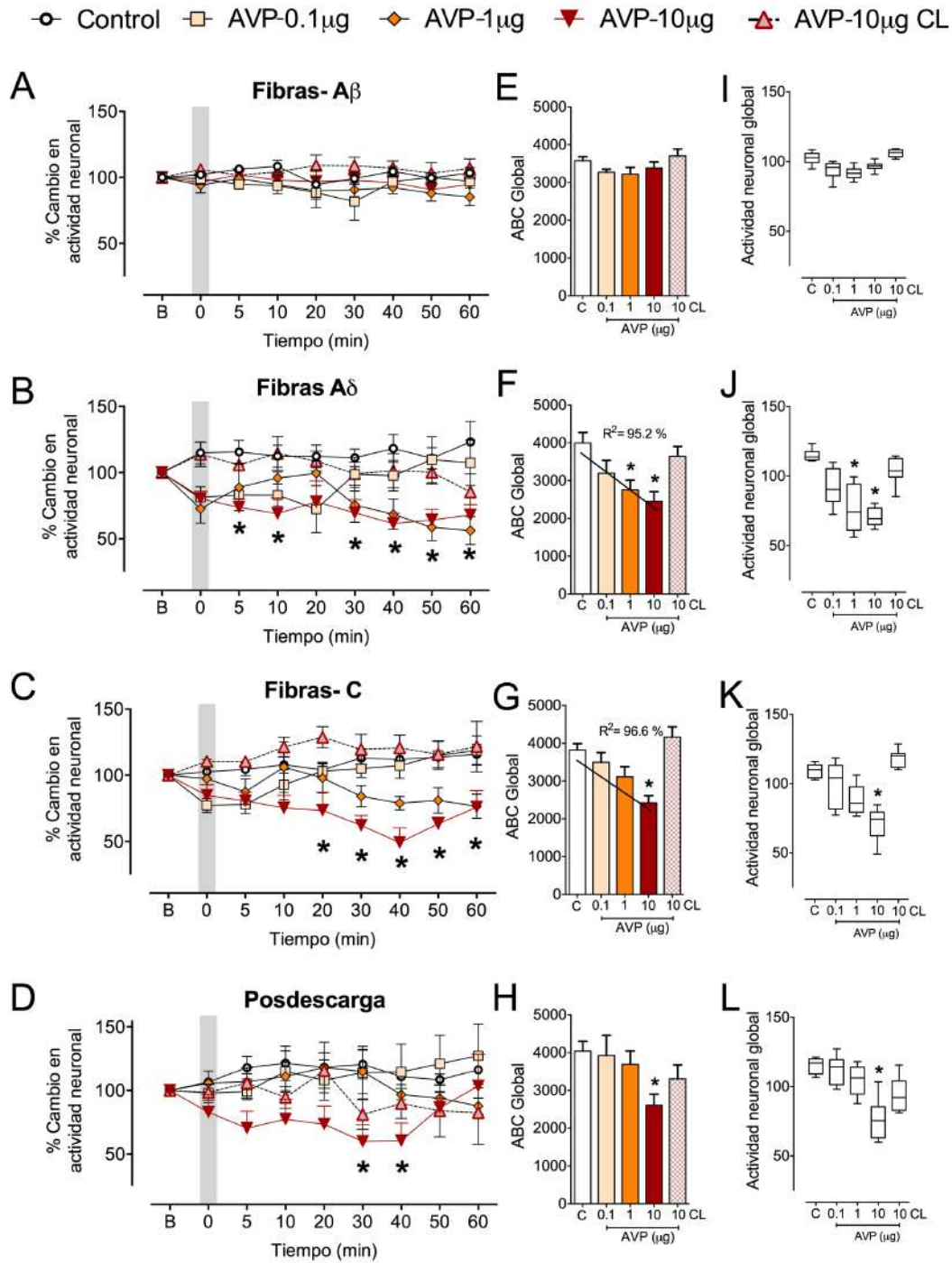


Figura 6. Efecto de la administración sc de AVP en el CRP sobre la actividad de neuronas de ARD en médula espinal. (A, B, C, D) Muestran el curso temporal de la actividad normalizada durante 60 minutos posteriores a la administración de AVP (línea punteada) para cada tipo de fibra. Diferencia significativa $*=p<0.05$, ANOVA 2 vías (control contra AVP-10 μ g). (E, F, G, H) Representan el área bajo la curva (ABC) construida con el curso temporal de la respuesta durante los 60 minutos posteriores a la administración del fármaco, se realizó un análisis de regresión lineal y se muestran los que resultaron significativos con sus respectivas R cuadradas (R²). (I, J, K, L) Muestran la distribución de los datos obtenidos, media (percentiles 95 y 5, valores mínimos y máximos). Diferencia significativa $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Dunnett

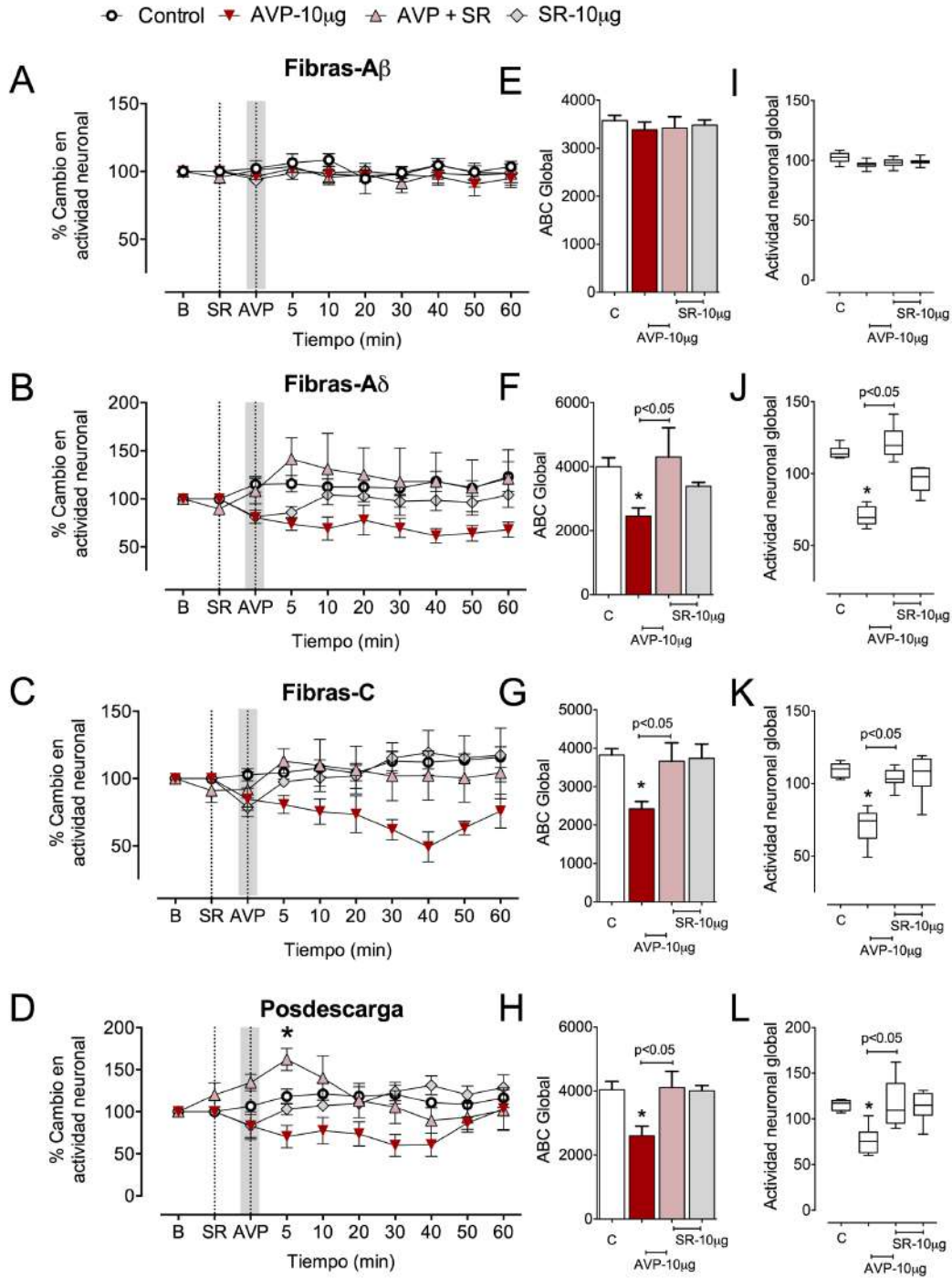


Figura 7. Efecto del pretratamiento con el antagonista del V1aR SR49059 (SR) sobre la acción de la AVP. (A, B, C, D) Muestran el curso temporal de la actividad normalizada durante 60 minutos posteriores al pretratamiento con el antagonista (SR) y a la administración de AVP (línea punteada) para cada tipo de fibra. Diferencia significativa $*=p<0.05$, ANOVA 2 vías (control contra AVP+SR). (E, F, G, H) Representan el área bajo la curva (ABC) construida con el curso temporal de la respuesta durante los 60 minutos posteriores a la administración del fármaco. (I, J, K, L) Se representa la distribución de los datos obtenidos, media (percentiles 95 y 5, valores mínimos y máximos).. Diferencia significativa $*=p<0.05$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

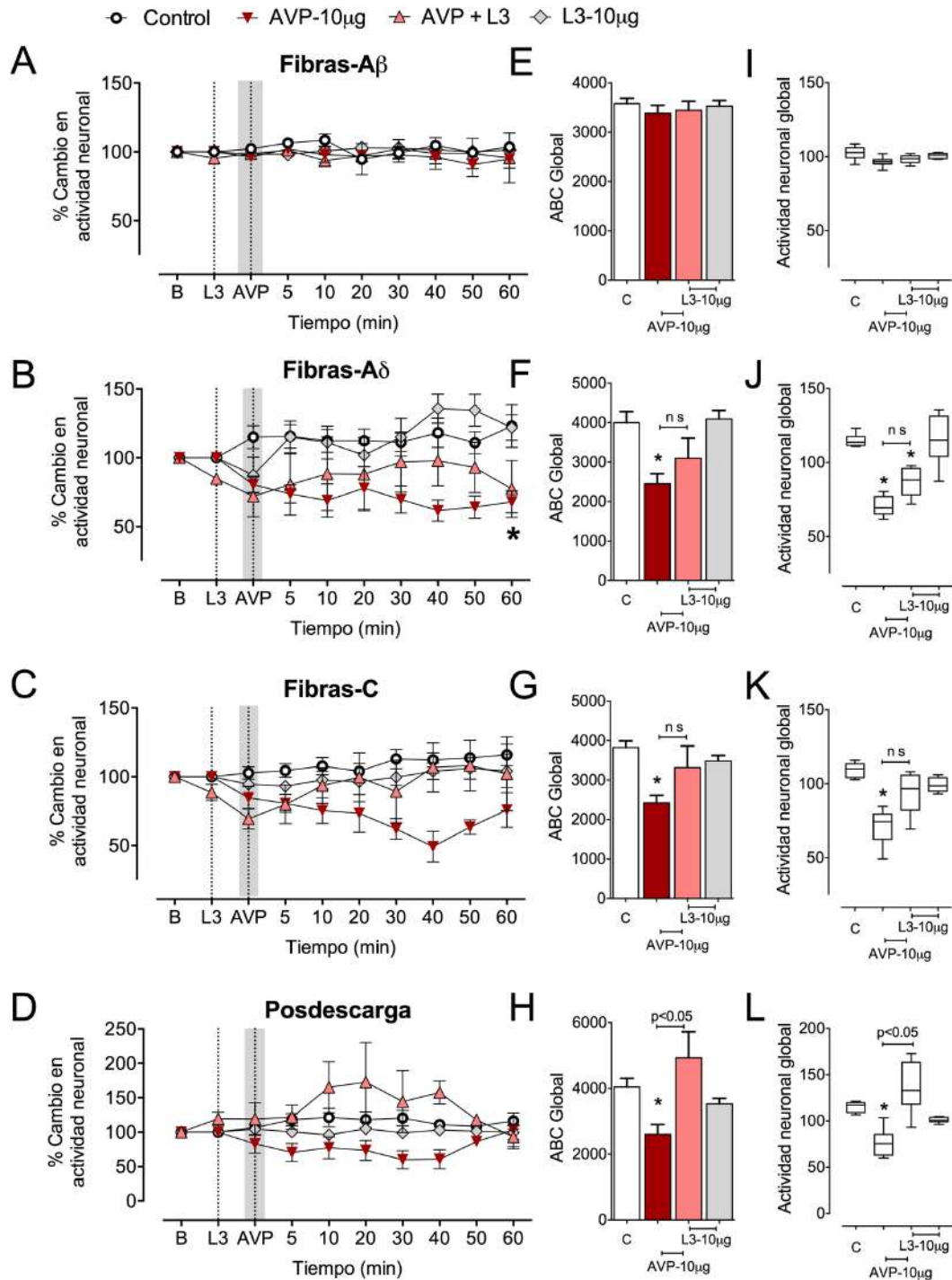


Figura 8. Efecto del pretratamiento con el antagonista del OTR L368,899 (L3) sobre la acción de la AVP. (**A, B, C, D**) Muestran el curso temporal de la actividad normalizada durante 60 minutos posteriores al pretratamiento con el antagonista (B) y a la administración de AVP (línea punteada) para cada tipo de fibra. Diferencia significativa $*=p<0.05$, ANOVA 2 vías (control contra AVP+L3). (**E, F, G, H**) Representan el área bajo la curva (ABC) construida con el curso temporal de la respuesta durante los 60 minutos posteriores a la administración del fármaco. (**I, J, K, L**) Muestran la distribución de los datos obtenidos, media (percentiles 95 y 5, valores mínimos y máximos). Diferencia significativa $*=p<0.05$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

8.1.7 Disminución del CO₂ espirado posterior a la administración periférica subcutánea de vasopresina

Después de la administración de AVP se presentaron cambios sistémicos importantes. Durante los experimentos electrofisiológicos, con el animal bajo anestesia general y ventilación asistida, se observó mediante capnografía, que la administración periférica sc de AVP 1 µg (n=6) y de 10 µg (n=6) provocó la disminución del CO₂ espirado entre los minutos 5 y 20 de su administración; este efecto no se encontró con la administración de OXT 31 µg (n=6) (**Fig. 9**).

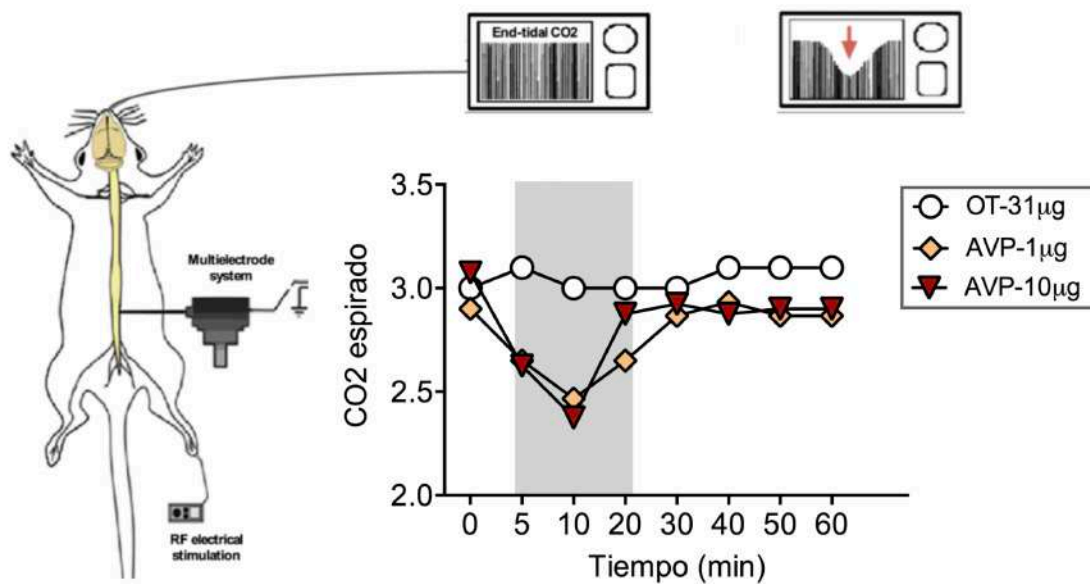


Figura 9. Efecto de la administración sc de OXT y AVP en el CO₂ espirado. Se muestra una representación del experimento electrofisiológico con monitorización del CO₂ espirado, la flecha roja indica el trazo de reducción del mismo 5 minutos después de administrarse la AVP. La gráfica muestra la reducción total del CO₂ espirado después de distintos tratamientos.

8.2 Experimentos conductuales

8.2.1 Conducta nociceptiva inducida por formalina

8.2.1.1 Efecto de la administración periférica de oxitocina sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina

La administración sc en la en la parte dorsal de la pata del animal de la rata evoca la conducta nociceptiva en forma de sacudidas de la pata. Estas pueden ser divididas en fases por su temporalidad: fase 1 (de 0 a 10 minutos después de la administración), interfase (del minuto 10 al 20) y fase 2 (del minuto 20 al min 60) que se ilustran en la **Fig. 10 A**. Se determinó el efecto de la aplicación periférica local sc de diferentes dosis de OXT-0.1, 10, 31 y 100 µg/pata sobre la conducta nociceptiva inducida por la administración intraplantar de formalina al 1% (**Fig. 10**).

Las dosis 0.1µg (n=8) y 10µg (n=9) no resultaron efectivas para disminuir la respuesta conductual inducida por formalina (expresadas como área bajo la curva). La dosis de 31 µg (n=8) de OXT disminuyó significativamente la fase 1 y la fase 2 del modelo de formalina. La dosis de 100 µg (n=5) de OXT produjo la inhibición significativa de la conducta nociceptiva de las fases 1, interfase y fase 2. La administración de OXT-100 µg en la pata contralateral a la administración de formalina no mostró efectos sobre la conducta nociceptiva (n=6).

8.2.1.2 Efecto del antagonista del receptor de oxitocina sobre la acción antinociceptiva de la oxitocina

El pretratamiento local con el antagonista L368,899 (L3)-10 µg (n=6), 5 minutos previos a la de OXT-31 µg, produjo un bloqueo total del efecto antinociceptivo de la OXT en el modelo de

formalina. La administración única del antagonista (10 μg , $n=5$) no provocó cambios *per se* en la conducta nociceptiva (**Fig. 11**).

8.2.1.3 Efecto del antagonista del receptor de vasopresina *V1a* sobre la acción antinociceptiva de la oxitocina

El pretratamiento local con el antagonista SR49059-10 μg ($n=6$), 5 minutos previos a la de OXT-31 μg , produjo un bloqueo total del efecto antinociceptivo de la OXT en el modelo de formalina. La administración única del antagonista ($n=5$) provocó un aumento significativo de la conducta nociceptiva durante la interfase y la fase 2 (**Fig. 12**).

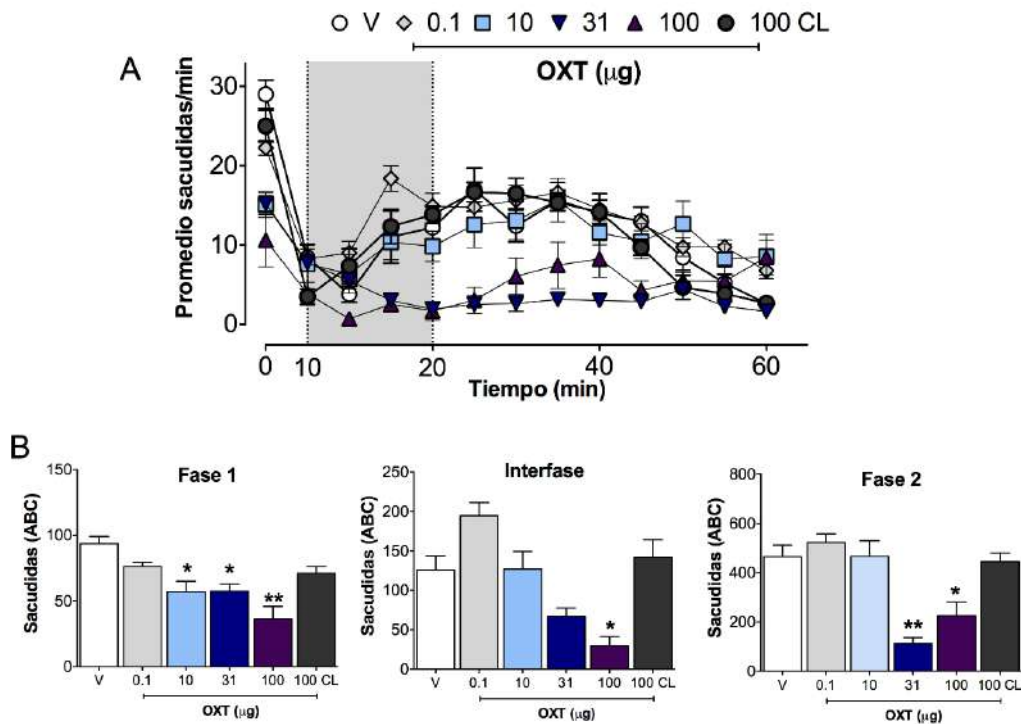


Figura 10. Modificación de la respuesta nociceptiva en el modelo de formalina por la aplicación sc de OXT. (A) Se observa el número promedio de sacudidas de pata para cada tiempo de medición durante 1 hora, se indica sombreado y entre líneas punteadas la interfase; V= vehículo (solución salina). (B) Se presentan las diferencias en la conducta nociceptiva expresada como área bajo la curva (ABC) en cada una de las fases, note la disminución de la conducta nociceptiva con la administración ipsilateral, pero no contralateral de OXT. Diferencia significativa $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Dunnett.

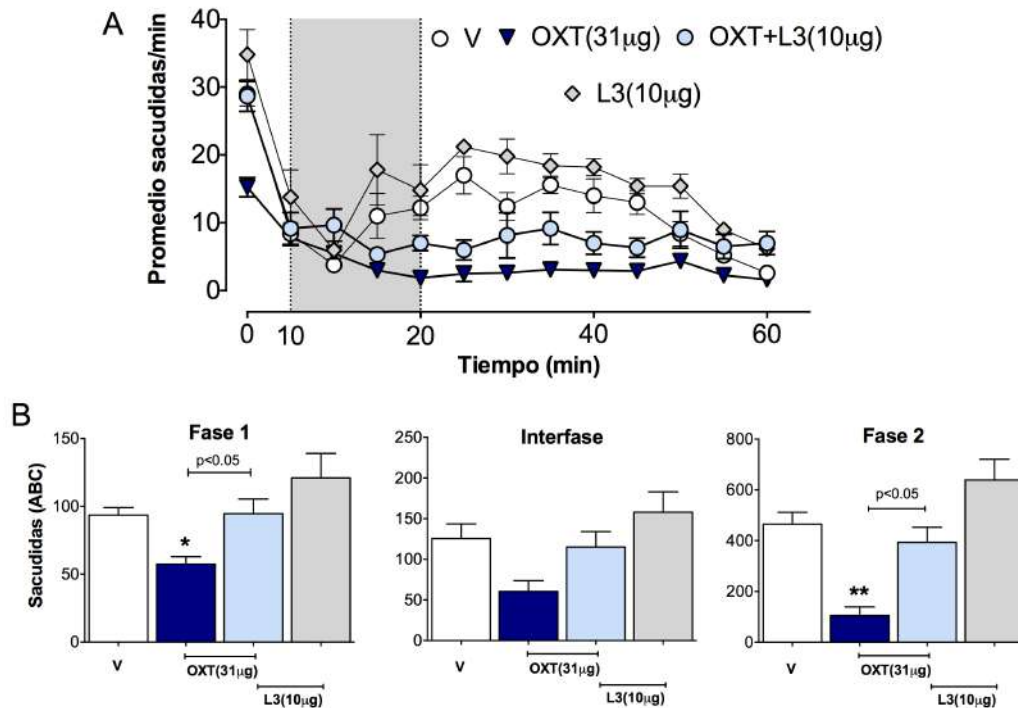


Figura 11. Efecto del pretratamiento con el antagonista del receptor de oxitocina L368,899 (L3) sobre la acción antinociceptiva de la OXT. (A) Se observa el número promedio de sacudidas de pata para cada tiempo de medición durante 1 hora, se indica en sombreado y entre líneas punteadas la interfase; V= vehículo (solución salina). (B) Se presentan las diferencias en la conducta nociceptiva expresada como área bajo la curva (ABC) en cada una de las fases. Diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

8.2.1.4 Efecto de la administración periférica de vasopresina sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina

Determinamos el efecto de la administración periférica local de diferentes dosis de AVP-0.1, 1 y 10 µg/pata sobre la conducta nociceptiva inducida por la administración intraplantar de formalina al 1% (**Fig. 13**). La dosis de 0.1 µg (n=6) no resultó efectiva para disminuir la respuesta conductual nociceptiva en ninguna fase. Las dosis de 1 (n=6) y 10 µg (n=6) provocaron la disminución significativa de la respuesta nociceptiva de las tres fases del modelo de formalina. La administración de AVP-10 µg (n=5) en la pata contralateral también disminuyó de forma significativa la respuesta nociceptiva de la fase 1 y la interfase y siguió el comportamiento del vehículo (V) durante la fase 2.

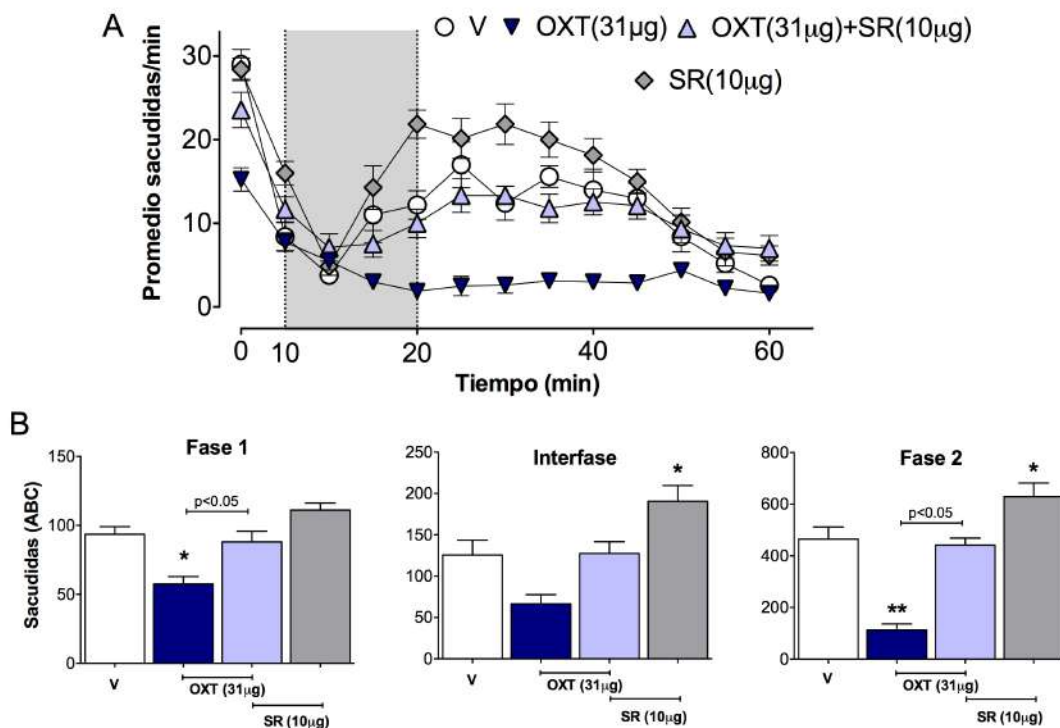


Figura 12 Efecto del pretratamiento con el antagonista del receptor de vasopresina SR49059 (SR) sobre la acción antinociceptiva de la OXT. (A) Se observa el número promedio de sacudidas de pata para cada tiempo de medición durante 1 hora, se indica en sombreado y entre líneas punteadas la interfase; V= vehículo (solución salina). (B) Se presentan las diferencias en la conducta nociceptiva expresada como área bajo la curva (ABC) en cada una de las fases. Diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

8.2.1.5 Efecto del antagonista del receptor de vasopresina $V1a$ sobre la acción antinociceptiva de la vasopresina

El pretratamiento local con el antagonista SR49059-10µg (SR) ($n=6$), 5 minutos previos a la de AVP-10µg, produjo un bloqueo parcial del efecto antinociceptivo de la AVP en la fase 2 del modelo de formalina, sin modificar la fase 1 e interfase. La administración única del antagonista ($n=7$) provocó un aumento significativo de la conducta nociceptiva al ser comparado con el vehículo (V) durante la interfase y la fase 2 (**Fig. 14**).

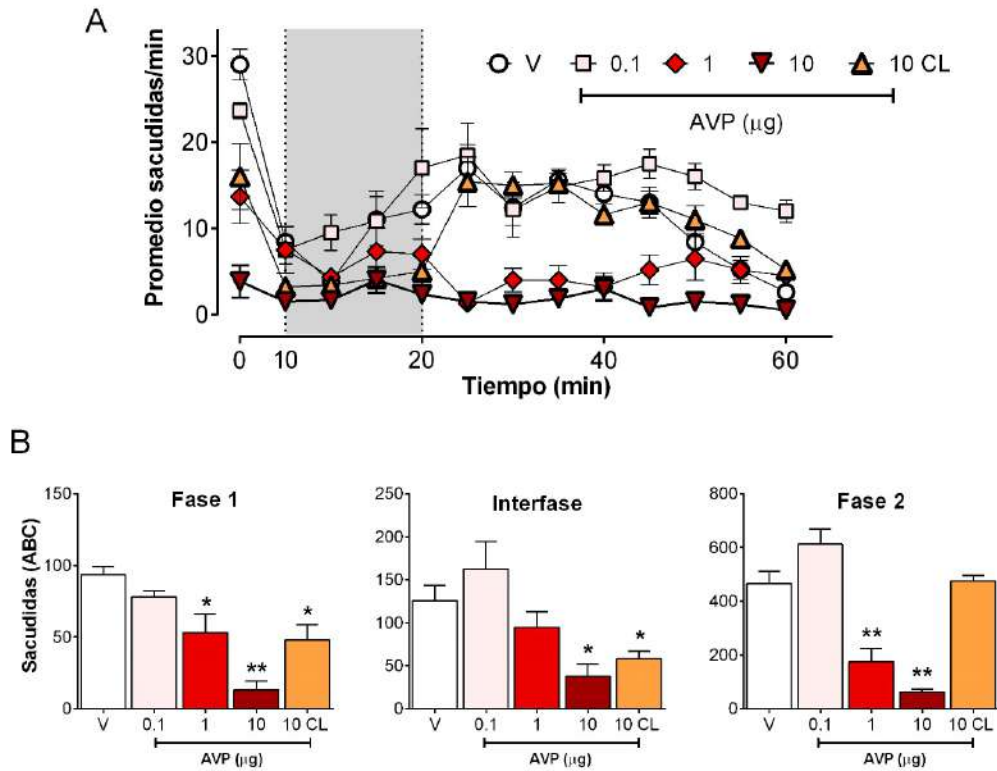


Figura 13. Modificación de la respuesta nociceptiva en el modelo de formalina por la aplicación sc de AVP. (A) Se observa el número promedio de sacudidas de pata para cada tiempo de medición, se indica sombreado y entre líneas punteadas la interfase. (B) Se presentan las diferencias en la conducta nociceptiva expresada como área bajo la curva (ABC) en cada una de las fases. Es posible que los efectos sobre la fase 1 y la interfase se deban a efectos sistémicos (discusión). Diferencia significativa $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Dunnett.

8.2.1.6 Efecto del antagonista del receptor de oxitocina OTR sobre la acción antinociceptiva de la vasopresina.

El pretratamiento local con el antagonista L368,899-10μg (n=9), 5 minutos previos a la de AVP-10μg, produjo un bloqueo parcial del efecto antinociceptivo de la AVP en la fase 2 del modelo de formalina, sin modificar la fase 1 e interfase. La administración única del antagonista (n=5) no provocó cambios *per se* en la conducta nociceptiva (Fig. 15).

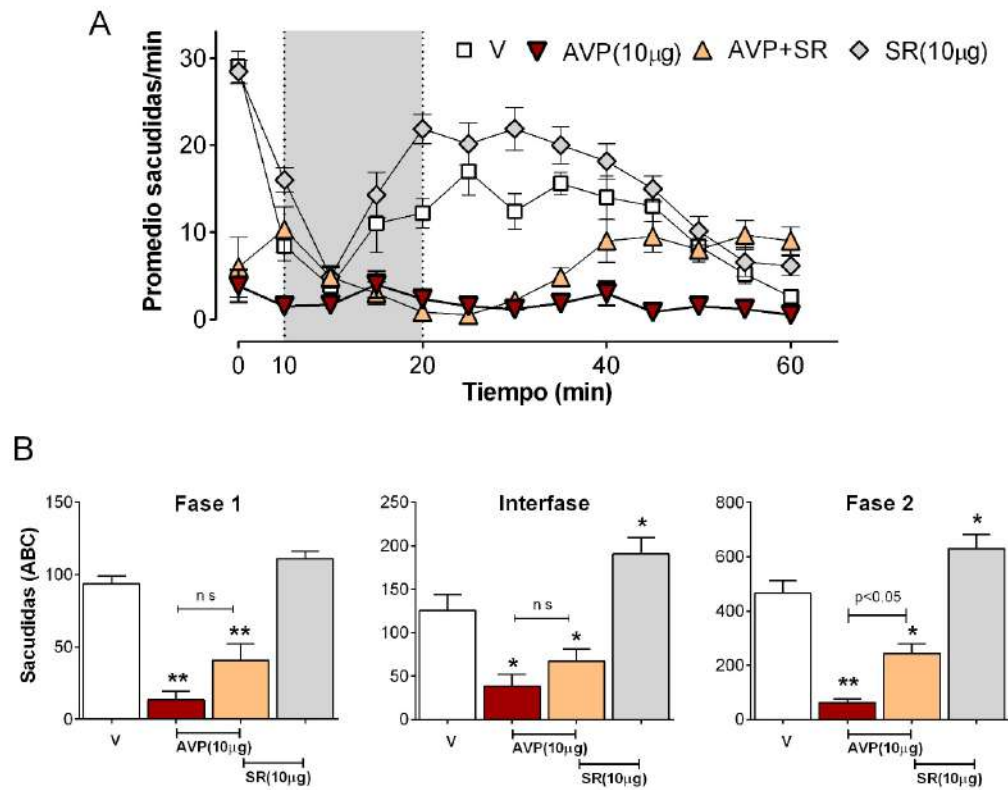


Figura 14. Efecto del pretratamiento con el antagonista del receptor de vasopresina SR49059 sobre la acción antinociceptiva de la AVP. (A) Se observa el número promedio de sacudidas de pata para cada tiempo de medición, se indica sombreado y entre líneas punteadas la interfase. (B) Se presentan las diferencias en la conducta nociceptiva expresada como área bajo la curva (ABC) en cada una de las fases. Diferencia significativa *= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

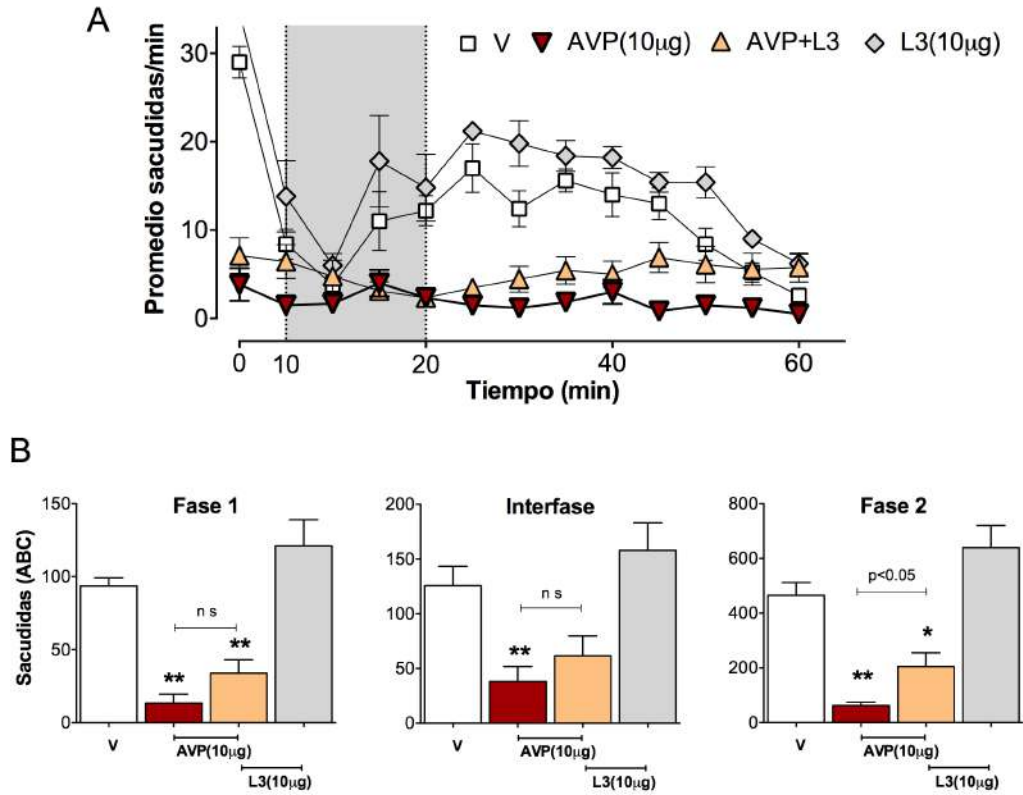


Figura 15 Efecto del pretratamiento con el antagonista del receptor de vasopresina L368,899 sobre la acción antinociceptiva de la AVP. (A) Se observa el número promedio de sacudidas de pata para cada tiempo de medición, se indica sombreado y entre líneas punteadas la interfase. (B) Se presentan las diferencias en la conducta nociceptiva expresada como área bajo la curva (ABC) en cada una de las fases. Diferencia significativa $*=p<0.05$. $**=p<0.01$, ANOVA 1 vía, prueba *post hoc* de Tukey.

8.2.2 Conducta motriz evaluada con *Rotarod*

Se determinó cada día experimental el tiempo promedio que duraba el animal sobre el cilindro del *Rotarod* durante tres ciclos de locomoción (**Fig. 16**). Los tiempos promedio que duraron los animales durante las pruebas control (sin administración de fármaco), después de la administración sc del vehículo (solución salina) y después de la administración de OXT (100 µg) no difirieron significativamente. Por otro lado, la administración sc de AVP (10 µg) redujo significativamente la duración de los animales sobre el cilindro motorizado (**Fig. 16 B**).

Determinamos que este efecto era transitorio, puesto que a 1 hora de haberse administrado la AVP el tiempo promedio que soportaba el animal sobre el *Rotarod* era similar al tiempo control.

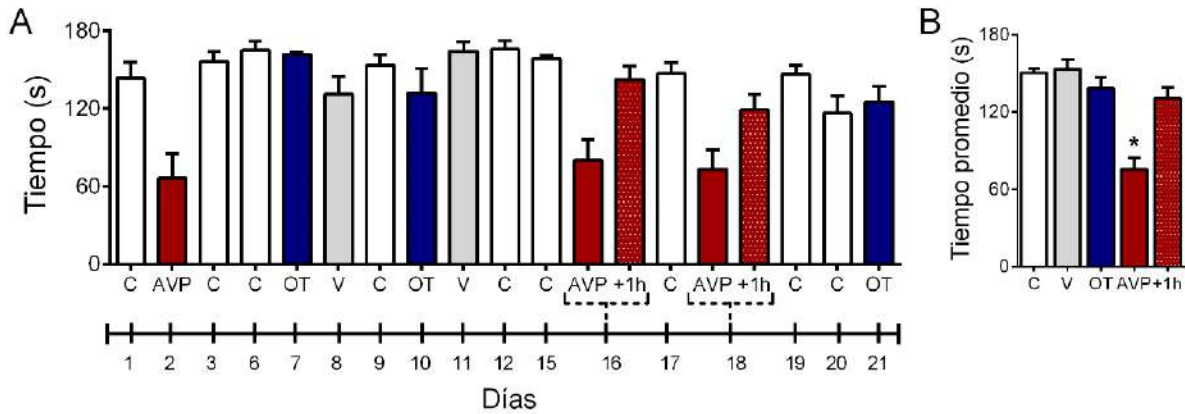


Figura 16 Efectos de la administración de OXT y AVP sobre la coordinación motora. (A) Se observa la media de tiempo de permanencia sobre el *Rotarod* en un curso temporal de 21 días en situación control (C) y los efectos de los tratamientos con AVP, OT y V (salina). AVP+1h representa el efecto en la coordinación motriz tras una hora de ser administrada la AVP. (B) Se indica el promedio de tiempo total sobre el *Rotarod* para cada tratamiento. * $p < 0.05$, ANOVA una vía, prueba *post hoc* de Dunnett.

8.3 Expresión de OTR en el nervio ciático evaluado por Western blot

Mediante análisis por Western blot identificamos que el OTR se expresa en el nervio ciático de ratas control (n=4). Sin embargo, contrario a nuestra hipótesis ni la inyección de solución salina (n=4) ni la de formalina (n=4) parecen modificar la expresión del péptido (**Fig. 17**)

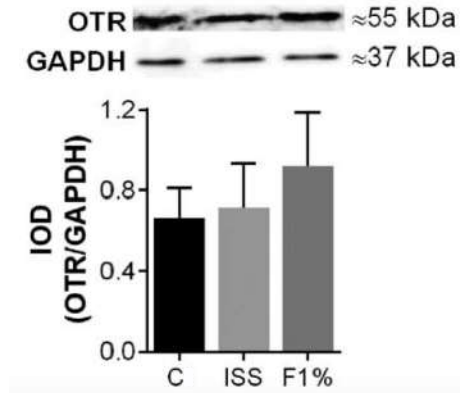


Figura 17 Expresión del receptor de oxitocina (OTR) en el nervio ciático. Arriba, western blot ejemplo que muestra la expresión del receptor de oxitocina (OTR) en el nervio ciático de un animal control y la expresión control de GAPDH . Abajo, expresión media del receptor representada mediante intensidad óptica integrada, no se observan cambios significativos entre la expresión de los animales control (C, n=4), animales a los que se les administró solución salina isotónica (ISS, n=4) y animales a los que se les inyectó formalina 1% (F1%, n=4).

8.4 Localización de OTR y V1aR por microscopía confocal

Con la finalidad de evaluar la localización del receptor periférico de oxitocina involucrado en los efectos antinociceptivos de la oxitocina se realizó una inmunofluorescencia triple para el OTR (verde), IB4 (rojo) y CGRP (azul). La figura 18 muestra la inmunofluorescencia en piel pilosa para el OTR, IB4 y CGRP en 3 experimentos diferentes. Se presenta la proyección en Z (**Fig. 18 Ai, Bi, Ci**), un solo plano focal (**Fig. 18 Aii, Bii, Cii**) y el control con la incubación únicamente del anticuerpo secundario. Es importante destacar que en ausencia del anticuerpo primario no se encontró marcaje no específico.

La figura 17 nos permite observar que el OTR colocaliza principalmente con el CGRP y no lo hace con el IB4 (**Fig. 19 Aiv, B**). Este resultado es más evidente con la ayuda de la proyección ortogonal (**Fig. 19 Aiv**), en la cual el color blanco representa sitios de colocalización de OTR con CGRP. Adicionalmente las imágenes **Ci a Civ** muestran un mismo plano óptico donde se observa la colocalización del OTR y CGRP y la ausencia de la misma entre el OTR y el IB4.

Adicionalmente, evaluamos la existencia de la expresión del receptor V1a en piel pilosa y su localización mediante inmunofluorescencia doble para V1a y OTR, con la finalidad de saber si colocalizaban ambos tipos de receptores. En la figura 20 se puede observar en la proyección en Z (**Fig. 20 A**) y en el plano focal (**Fig. 20 B**) la inmunofluorescencia al V1aR al OTR y la ausencia de colocalización en los empalmes de ambas proyecciones. Es interesante hacer notar que si bien no hay colocalización de los receptores ambos se encuentran en proximidad, como se ilustra en la proyección ortogonal (**Fig. 20 C**).

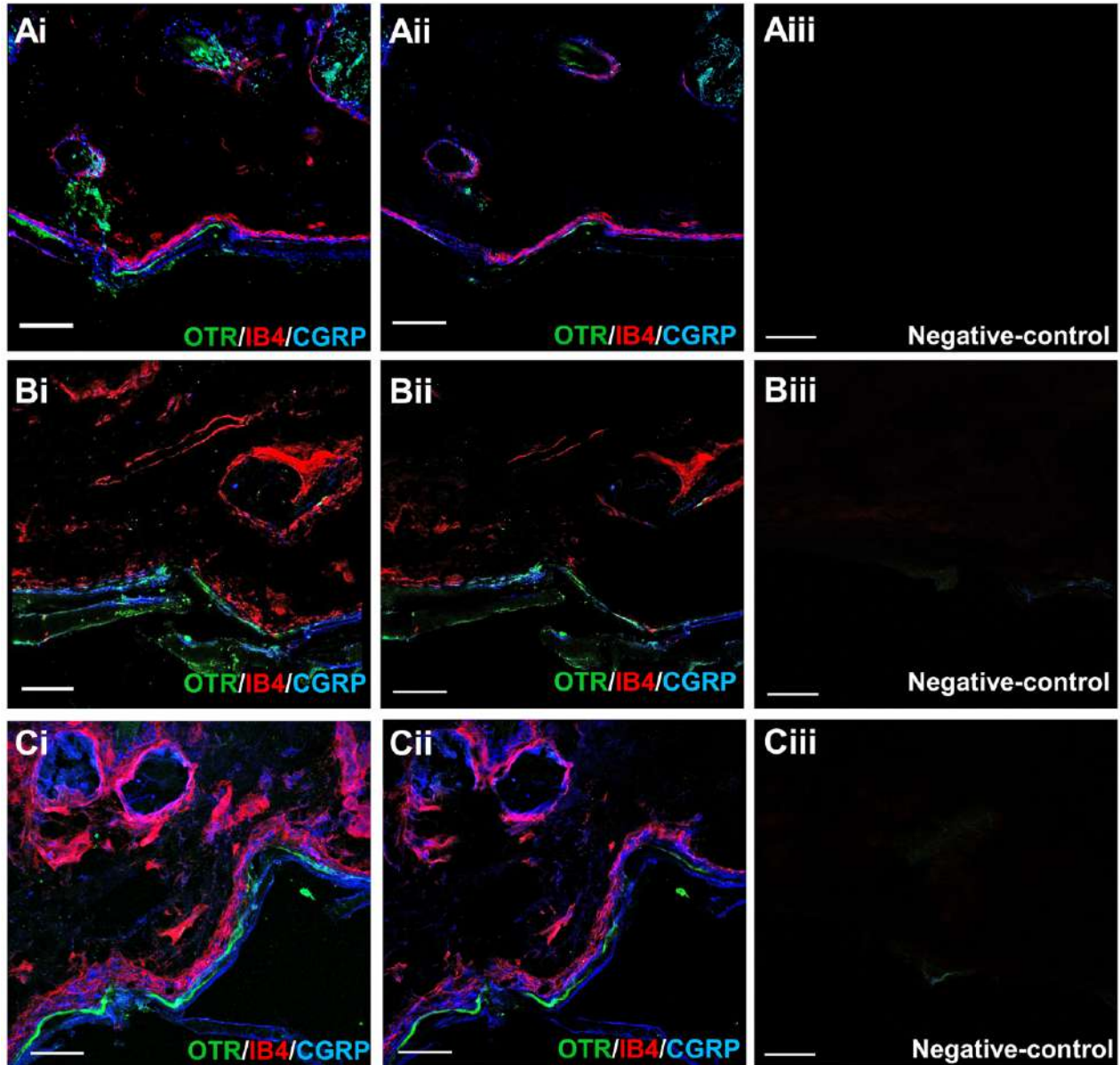


Figura 18. Imagen de microscopía confocal de corte de piel pilosa con inmunofluorescencia para OTR, CGRP e IB4. (Ai, Bi, Ci) son proyecciones en Z (40 planos ópticos, 25x/0.8 AN) de 3 distintos experimentos. (Aii, Bii, Cii) plano óptico obtenido de la proyección en Z donde se observa la mayor inmunofluorescencia para OTR (25x/0.8 AN). (Aiii, Biii, Ciii) experimentos control con la incubación del anticuerpo secundario en ausencia del anticuerpo primario (25x/0.8 AN). Barras de escala: 50 μ m.

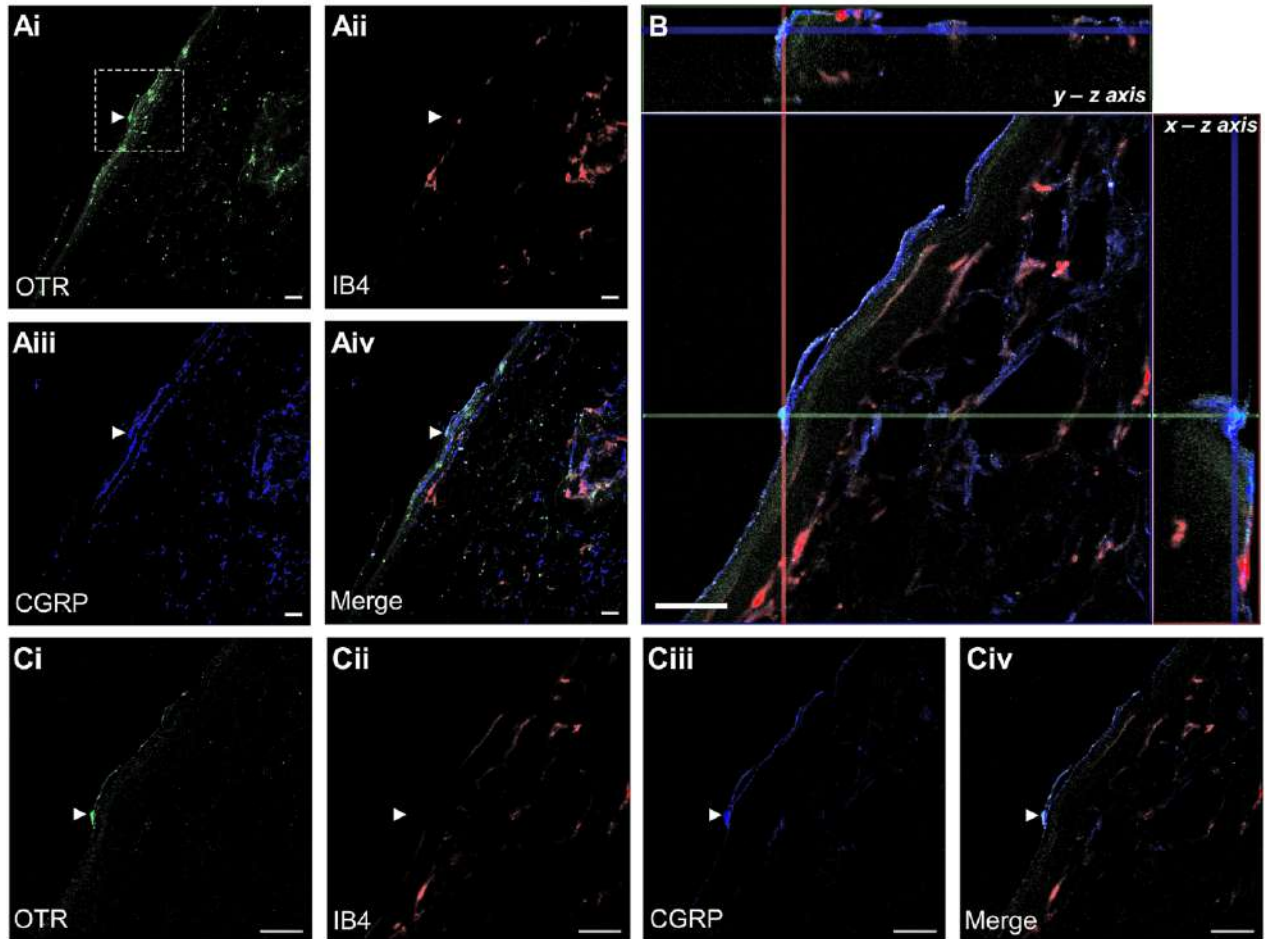


Figura 19. Colocalización del OTR y CGRP. (Ai, Aii, Aiii, Aiv) son proyecciones en Z (8 planos ópticos, 25x/0.8 AN) en las cuales se observa la inmunofluorescencia al OTR en verde (Ai), al IB4 en rojo (Aii), al CGRP en azul (Aiii) y el empalme (Aiv). La flecha blanca indica una terminación nerviosa libre positiva a OTR. (B) muestra la proyección ortogonal en Z (8 planos ópticos, 40x/1.3 AN) del área encuadrada en Ai; los ejes y z y x muestran la colocalización del OTR con CGRP, pero no con IB4. (Ci, Cii, Ciii, Civ) muestran la inmunofluorescencia a OTR, IB4, CGRP y el empalme en un mismo plano óptico (25x/0.8 AN), nótese la coincidencia en el plano de la inmunofluorescencia al OTR y CGRP, pero no al IB4 (flecha blanca). Barras de escala: 50 μ m.

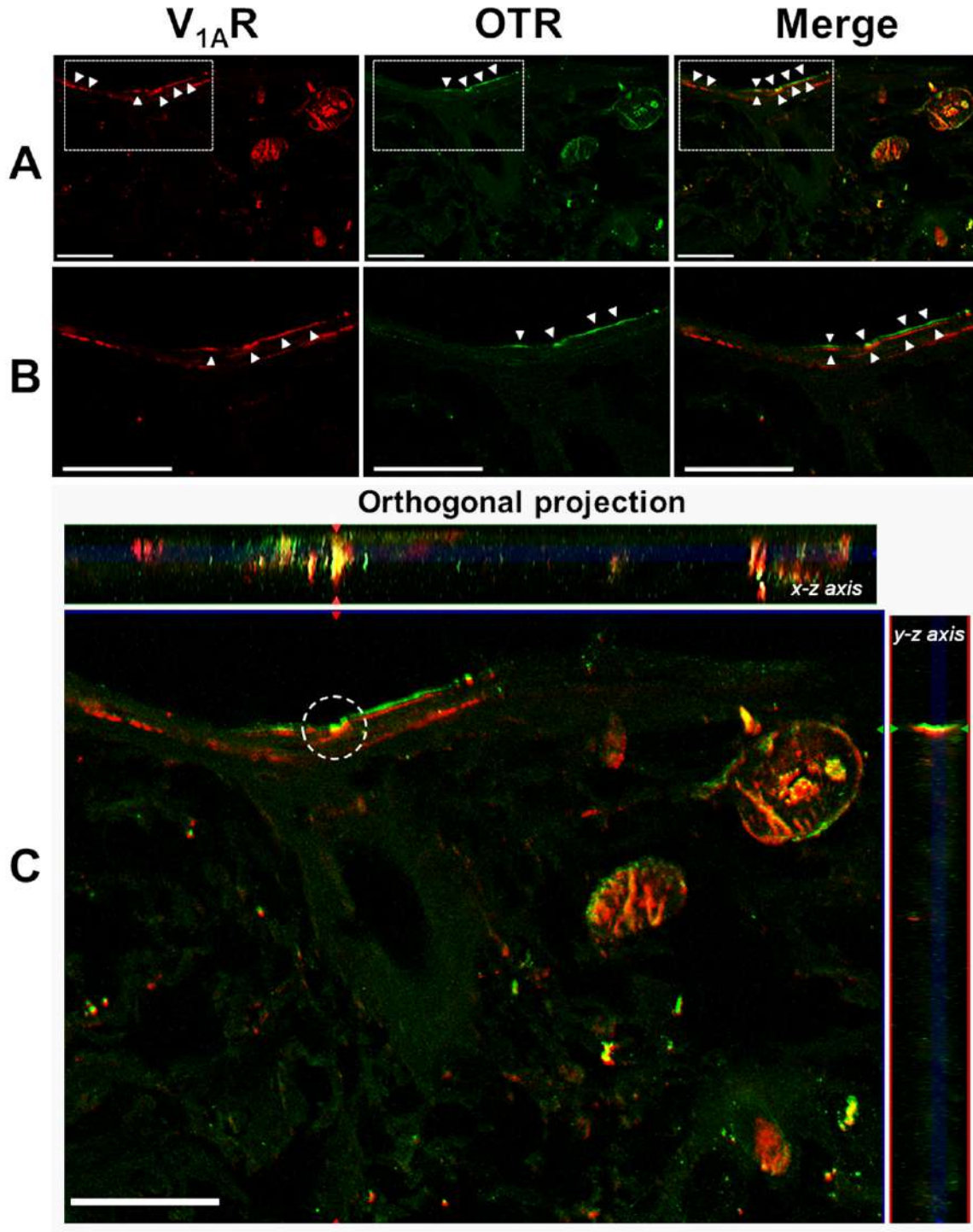


Figura 20. Imagen de microscopía confocal de corte de piel pilosa con inmunofluorescencia para V1aR y OTR. (Panel A) son proyecciones en Z (4 planos ópticos, 25x/0.8 AN). (Panel B) plano óptico obtenido de la proyección en Z donde se observa la mayor inmunofluorescencia para V1a y OTR (25x/0.8 AN). Barras de escala: 50 μm . (Panel C) muestra la proyección ortogonal en Z (4 planos ópticos, 25x/1.3 AN). En A, B y C puede observarse la ausencia de colocalización del V1aR y el OTR.

9. Discusión

El presente trabajo demuestra con evidencia electrofisiológica y conductual que la administración sc de OXT y AVP produce antinocicepción. Mediante el uso de antagonistas específicos encontramos datos que sugieren que tanto los OTR como los V1aR participan en dicho efecto antinociceptivo. Además con el uso de antagonistas, *Western-Blot* y microscopía de inmunofluorescencia reportamos, por primera vez en la literatura, que los receptores OTR y V1aR se expresan por las terminaciones nerviosas en la piel. Finalmente, en conjunto nuestros datos señalan que la OXT posee mayor potencial traslacional para su aplicación clínica, debido a que carece de los efectos sistémicos que encontramos al administrar AVP.

Previamente se demostró en distintos modelos que las neurohormonas OXT y AVP tienen múltiples funciones antinociceptivas tanto a nivel central (Condés-Lara et al., 2006; 2008; Miranda-Cardenas et al., 2006; Yang et al., 2006 a,b,c; Martinez-Lorenzana et al., 2008; Rojas-Piloni et al., 2008; DeLaTorre et al., 2009; Eliava et al., 2016) como periférico (Berkowitz y Sherman, 1982; Berson et al., 1983; Uvnäs-Moberg et al., 1992; Arletti et al., 1993; Schorsch-Petcu, et al., 2010; Juif y Poisbeau, 2013). Sobre el efecto periférico, en la mayoría de estudios previos administraron los péptidos vía intraperitoneal o vía intravenosa e hipotetizaron que las acciones antinociceptivas observadas podrían llevarse a cabo en los ganglios de la raíz dorsal. El presente estudio explora la posibilidad de que la OXT y la AVP funcionen como moléculas antinociceptivas a nivel periférico. Para abordar dicha hipótesis de trabajo utilizamos técnicas de electrofisiología, modelos conductuales, técnicas de biología molecular y microscopía de inmunofluorescencia. Además investigamos algunas evidencias farmacológicas del posible receptor involucrado en los efectos antinociceptivos de ambas hormonas. Finalmente, ante la ausencia en la literatura de la descripción del receptor de OXT y del receptor de V1a de AVP en

terminaciones nerviosas periféricas, examinamos mediante biología molecular y microscopía de inmunofluorescencia la existencia de dichos receptores en la piel.

9.1 Efecto antinociceptivo de la administración subcutánea de oxitocina

Encontramos dos evidencias electrofisiológicas y conductuales del efecto antinociceptivo de la OXT a nivel periférico local.

9.1.1 Evidencias electrofisiológicas

La administración sc de OXT redujo selectivamente la actividad evocada por fibras A δ y C, mientras que no modificó de forma significativa la actividad evocada por fibras A β . Este es un dato que sugiere un efecto antinociceptivo específico pues las fibras A δ y C conducen predominantemente información de tipo nociceptivo en condiciones fisiológicas, al contrario las fibras A β son táctiles y propioceptivas bajo las mismas condiciones (Basbaum et al., 2009). Es interesante hacer notar que dicho efecto se comportó de forma dosis-dependiente y que fue duradero ya que se mantuvo durante al menos 60 minutos después de administrarse el fármaco, dato que concuerda con lo reportado en la literatura.

9.1.2 Evidencias conductuales

El otro modelo en donde encontramos un efecto antinociceptivo de la OXT fue el modelo de dolor subagudo producido por la administración sc de formalina. Después de la administración de formalina en la pata trasera, el animal de experimentación presenta una respuesta conductual

nociceptiva (sacudidas de pata) dividida en 3 fases diferenciables. La fase 1 se presenta en los primeros 10 minutos después de administrada la formalina, se postula que es principalmente mediada por la estimulación química directa de los nociceptores (principalmente a través de receptores de la familia TRP) (McNamara et al., 2007). Posteriormente se presenta una interfase con una duración aproximada de 10 minutos, caracterizada por una disminución en la conducta nociceptiva; no es claro si la disminución en la respuesta conductual es producida por la modulación central de la nocicepción o por ausencia del efecto de la formalina. Por último, se presenta la fase 2, la cual se extiende entre los minutos 20 y 60 después de inyectada la formalina; esta fase parece estar provocada por la respuesta inflamatoria periférica y la sensibilización a nivel central (Wheeler-Aceto et al., 1990; Tjølsen et al., 1992). La administración periférica de OXT en el mismo sitio que la formalina produjo una disminución en las fases 1 y 2, con mayor intensidad durante la última. La antinocicepción provocada es de carácter local, debido a que la administración contralateral de la dosis más alta de OXT no disminuyó la conducta nociceptiva en ninguna fase del modelo de formalina.

9.1.3 Complementariedad de los efectos encontrados

Ambas evidencias del efecto antinociceptivo de la OXT resultan compatibles y complementarias. El efecto sobre las fibras A δ y C se presentó en los primeros minutos posteriores a la administración de OXT, de la misma manera que durante la fase 1 del modelo de formalina. Se postuló que esta última es predominantemente mediada por la activación de receptores TRP (McNamara et al., 2007), mientras que los receptores TRP son principalmente expresados por las fibras las fibras A δ y C (González-Ramírez et al., 2017). Por lo tanto, esta correlación apunta a la

posibilidad de que la OXT esté actuando sobre estos tipos de fibras independientemente del estímulo nocivo que las active.

9.1.4 Otros mecanismos posibles de la OXT periférica

La OXT produce un efecto antinociceptivo pronunciado durante la fase 2 del modelo de formalina. Dicha fase está mediada por distintos mecanismos de inflamación local y en este sentido resulta importante subrayar que se conocen múltiples funciones antiinflamatorias de la OXT (Li et al., 2017). De hecho, un estudio previo (Petersson et al., 2001) evaluó el efecto de la administración sc de OXT junto con el compuesto proinflamatorio denominado carragenina. En ese trabajo reportaron que la OXT prevenía el desarrollo de edema con la misma potencia que la dexametasona, además de que disminuía el reclutamiento local de neutrófilos. Es posible entonces que la OXT actúe mediante distintos mecanismos de acción antinociceptivos, directamente sobre la fibra nerviosa e indirectamente modulando la respuesta inflamatoria local. Finalmente, este mecanismo antiinflamatorio local podría estar actuando de manera fisiológica ya que los queratinocitos y los fibroblastos tienen la capacidad de sintetizar y secretar OXT en la piel como respuesta a moléculas inflamatorias (Denda et al., 2012; Deing et al., 2013).

9.2 Efecto antinociceptivo de la administración subcutánea de vasopresina

Como se mencionó en el marco teórico existen distintos reportes sobre el efecto antinociceptivo producido por la administración periférica de AVP (Berkowitz and Sherman, 1982; Berson et al., 1983; Schorscher-Petcu et al., 2010; Mogil et al., 2011; Qiu et al., 2014a,b). Las hipótesis que surgió de dichos trabajos postulaba que la AVP sistémica podría actuar en los

ganglios de la raíz dorsal aumentando la función del receptor GABA_A (Qiu et al, 2014b) o inhibiendo los canales iónicos sensibles al ácido (ASICs) (Qiu et al, 2014a). Hasta nuestro conocimiento únicamente un trabajo sugirió que la AVP de manera periférica local podría producir antinocicepción (Qiu et al, 2014a). En este artículo Qiu y colaboradores describen que la administración sc tanto de AVP como de OXT reduce la conducta nociceptiva inducida por la inyección de ácido acético, un agonista de los ASICs. Con nuestro trabajo ampliamos dicho conocimiento al describir que la AVP produce antinocicepción tanto en un modelo electrofisiológico como en uno conductual, además de señalar la presencia del V1aR en terminaciones nerviosas en la piel.

9.2.1 Evidencias electrofisiológicas

Con relación al modelo electrofisiológico encontramos que la AVP produce una disminución selectiva de la actividad mediada por fibras A δ y C, de forma similar a lo descrito para la OXT. Pero a diferencia de esta última la administración sc de AVP produjo un efecto sistémico sustancial señalado por la disminución transitoria del CO₂ espirado como explicamos a continuación. Nuestros animales de experimentación fueron monitorizados durante los experimentos electrofisiológicos mediante electrocorticografía (para evaluar el mantenimiento de la anestesia) y capnografía (para evaluar estado cardiopulmonar y calidad de la ventilación asistida). Como mostramos, se presentó una reducción acentuada del CO₂ espirado entre 5 y 20 minutos con un mínimo a los 10 minutos después de ser administrada la AVP (1 y 10 μ g) pero no con la OXT (31 μ g). La presencia de este efecto sistémico nos hizo preguntarnos si sería posible que esta influyera en la reducción de la actividad mediada por fibras A δ y C. Por lo que en un grupo adicional de experimentos inyectamos la AVP en la pata contralateral a la del campo

receptivo periférico. Encontramos como era de esperar que la reducción del CO₂ se mantuvo con independencia del sitio de administración de la AVP; pero no la reducción de la actividad evocada, la cual únicamente se presentó cuando se administró el péptido directamente en el campo receptivo periférico. Hipotetizamos que esta reducción del CO₂ espirado puede deberse a los efectos vasculares de la AVP; la vasoconstricción e hipoperfusión transitoria de distintos lechos vasculares producirían una disminución del transporte de CO₂ desde la periferia hasta los pulmones (Anderson y Breen, 2000) reduciendo así el CO₂ espirado.

9.2.2 Evidencias conductuales

Posteriormente investigamos si la administración sc de AVP producía un efecto antinociceptivo en el modelo de formalina. Los resultados indicaron que la AVP produce una disminución significativa de la fase 1, interfase y fase 2 de dicho modelo. Sin embargo, cuando evaluamos el posible efecto sistémico de la AVP al inyectarla en la pata contralateral a la de la formalina, resultó notorio un aplanamiento de la fase 1 y la interfase. Además, observamos un comportamiento de aparente sedación o disfunción motriz durante los primeros minutos de ser inyectado este péptido. Quisimos investigar cuantitativamente la probable disfunción motriz producida por AVP (Andrews et al., 1983; Ettenberg et al., 1983). Con este objetivo realizamos un nuevo grupo de experimentos en el modelo de coordinación motriz con *Rotarod*. Por medio de esta aproximación concluimos que efectivamente la AVP produce disfunción motriz transitoria; por el contrario, es importante mencionar que la OXT no producía este efecto.

9.2.3 Interpretación de los datos obtenidos, distinción del efecto local del sistémico

En suma, interpretamos los anteriores resultados de la siguiente manera: La administración de AVP produce un efecto antinociceptivo (en un modelo electrofisiológico y uno conductual); sin embargo, dicho efecto es enmascarado en los primeros 20 minutos por una acentuada respuesta sistémica, como la señala la reducción del CO₂ espirado y el aplanamiento de la fase 1 e interfase del modelo de formalina. Después de la resolución del efecto sistémico (primeros 20 min.) resulta discernible el efecto antinociceptivo local de la AVP, ilustrado por el mantenimiento de (1) la reducción de la actividad neuronal evocada y (2) la disminución de la fase 2 del modelo de formalina únicamente cuando la AVP se administró en la pata ipsilateral a la de la formalina.

9.2.4 Otros mecanismos posibles de la administración de AVP

Una duda que surge es si es posible que la AVP produzca analgesia a través de sus efectos vasculares (László et al., 1991) puesto que se sabe que la hipertensión puede producir analgesia (Dworkin et al., 1979). Si bien esta posibilidad no fue abordada en el presente estudio, trabajos previos reportaron que no existe una correlación entre los efectos vasopresores de la AVP y sus efectos antinociceptivos (Berkowitz and Sherman, 1982; Berson et al., 1983).

Se conoce que la AVP tiene funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Russel y Walley, 2010) las cuales pueden contribuir a la reducción de la fase 2 del modelo de formalina reportada en este estudio. Es interesante mencionar que la inyección sc del antagonista del V1aR incrementó significativamente la conducta nociceptiva de la fase 2 del modelo de formalina; resultado que es consistente con el reporte en la literatura que señala que ratones knockout (KO) al V1aR presentan un incremento en la fase señalada (Schorscher-Petcu et al., 2010). Ambos datos sugieren un potencial efecto fisiológico antiinflamatorio y antinociceptivo de la AVP.

Finalmente, se puede plantear la pregunta si la AVP periférica podría estar actuando en el sistema nervioso central como lo sugiere su efecto sobre la coordinación motriz. En este sentido se reportó que es posible que concentraciones elevadas de AVP puedan cruzar la barrera hematoencefálica (Zlokovic et al., 1990). Si bien no descartamos categóricamente en el presente proyecto la presencia de algún efecto antinociceptivo central, es poco probable que influya en los resultados obtenidos. Esto debido a que la administración contralateral (a la estimulación eléctrica y a la inyección de formalina) no redujo la actividad neuronal evocada por fibras A δ y C ni la fase 2 del modelo de formalina, lo que sería esperable en caso de que el efecto antinociceptivo se diera a nivel central. Además, Rojas-Piloni y colaboradores (2010) en un trabajo previo, usando una preparación electrofisiológica experimental similar a la utilizada en el presente estudio, reportaron que la administración espinal de AVP no reduce la actividad evocada por fibras A δ y C. Lo que sugiere que la reducción que encontramos en el presente trabajo se está llevando a cabo a nivel periférico.

9.3 Receptores involucrados en los efectos antinociceptivos de la OXT y la AVP

9.3.1 Evidencias farmacológicas del papel del OTR y V1aR

Como mencionamos en el marco teórico existe debate sobre el o los receptores que median la antinocicepción inducida por OXT y AVP tanto a nivel central como a nivel periférico. Existe evidencia de que la OXT produce antinocicepción a través de la activación del OTR (Uvnäs-Moberg et al., 1992, 1993; Arletti et al., 1993; Yang, 1994; Robinson et al., 2002; Yang et al., 2002; Condés-Lara et al., 2006, 2008, 2009; Miranda-Cardenas et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2007, 2010) y que a su vez la AVP produce antinocicepción a través de la unión al V1aR

(Berkowitz y Sherman, 1982; Kordower y Bodnar, 1984). Sin embargo, también hay reportes de que la OXT usa al V1a (Schorscher-Petcu et al., 2010; Qiu et al., 2014a; Kubo et al., 2017; Han et al., 2018). Para estudiar el o los posibles receptores involucrados utilizamos 2 antagonistas no peptídicos de alta afinidad de los receptores OTR y V1aR (Serradeil-Le Gal et al., 1993; Williams et al., 1994). Los datos que surgen del presente trabajo sugieren que al menos en los modelos utilizados ambos receptores participan en los efectos antinociceptivos de la OXT y la AVP.

En el modelo electrofisiológico, el pretratamiento con los antagonistas para ambos receptores, bloqueó de manera parcial el efecto antinociceptivo de la OXT. Un hallazgo similar fue encontrado en el modelo de formalina, ya que ambos antagonistas previnieron de manera completa el efecto antinociceptivo de la OXT en las fases 1 y 2.

Por el contrario, los V1aR parecen ser más específicos en la antinocicepción mediada por AVP. Esto debido a que el bloqueo de estos receptores previene de manera completa la acción de la AVP sobre la actividad evocada por fibras A δ y C, mientras que el antagonista del OTR únicamente revierte de manera parcial dicho efecto antinociceptivo. Sin embargo, ninguno de los dos antagonistas logró bloquear la reducción inducida por AVP de la fase 1 e interfase del modelo de formalina, quizá por la importante respuesta sistémica durante los primeros minutos de administrada la AVP.

En resumen, estos resultados sugieren que ambos receptores OTR y V1aR están implicados en los efectos antinociceptivos de la OXT y la AVP, al menos en los 2 modelos de nocicepción utilizados en el presente estudio. Nuestra hipótesis es que puede haber especificidad en los receptores implicados en algunas regiones y sistemas; un ejemplo de ello es el sistema trigeminovascular de la rata, puesto que la OXT produce antinocicepción específicamente a través del V1aR en el ganglio de Gasser (Kubo et al., 2017) y a través del OTR en el complejo trigeminocervical (García-

Boll et al., 2018). Sin embargo, en otras regiones, ambos receptores pueden coexistir con funciones análogas y complementarias, por ejemplo en las terminaciones nerviosas libres cutáneas. Aunque la evidencia farmacológica de la participación de ambos receptores es contundente, hasta este trabajo no había sido descrita la presencia de OTR y V1aR en las terminaciones nerviosas periféricas.

9.3.2 Evidencias por biología molecular e histología de la presencia del OTR y V1aR en terminaciones nerviosas periféricas

Si bien los resultados discutidos arriba nos permiten conocer que OTRs y V1aRs periféricos participan en los efectos antinociceptivos de la OXT y AVP, quisimos conocer la localización de dichos receptores. La primera aproximación experimental llevada a cabo con esta finalidad fue la técnica de Western blot, con la cual encontramos que la proteína del OTR se expresa en el nervio ciático de la rata. Contrario a nuestra hipótesis esta expresión no se modificó significativamente 1 día después de administrar formalina sc en la pata del animal de experimentación, aunque si se observó una tendencia al incremento de la expresión.

Una vez definida la existencia del receptor en el nervio ciático, evaluamos en qué tipo de fibras está expresado el OTR. Las fibras C se clasifican como peptidérgicas y no peptidérgicas, las primeras expresan la proteína CGRP y las segundas IB4. En la inmunofluorescencia triple para CGRP, IB4 y OTR encontramos que el último colocaliza principalmente con el CGRP y lo hace en menor medida con el IB4. Si bien se había reportado previamente la presencia del OTR en cuerpos neuronales de ganglios de la raíz dorsal (Moreno-López et al., 2013), el presente es el primer reporte en la literatura de la presencia del OTR en terminaciones nerviosas libres.

Finalmente investigamos si el V1aR colocalizaba con el OTR en terminaciones nerviosas libres. Previamente se publicó que en ganglios de la raíz dorsal el RNA mensajero del V1aR es acentuadamente expresado por neuronas de pequeño y mediano diámetro (Schorscher-Petcu et al., 2010), el tipo de neuronas aferentes primarias que poseen fibras de tipo A δ y C. En este trabajo, encontramos mediante inmunofluorescencia que el V1aR si está presente en terminaciones nerviosas cutáneas; sin embargo, a pesar de encontrarse con una estrecha aproximación al OTR no encontramos ejemplos de colocalización.

En conjunto la evidencia electrofisiológica, conductual e histológica apuntan a que la OXT y AVP administradas de forma sc producen antinocicepción a través de la activación de OTRs y V1aRs presentes en terminaciones nerviosas cutáneas.

10. Consideraciones finales y perspectivas del proyecto

Durante mucho tiempo se ha estudiado el papel antinociceptivo de la OXT y de la AVP, a pesar de esto continuamos descubriendo nuevas funciones, sitios y mecanismos de acción de estos péptidos. El presente trabajo amplía el conocimiento sobre la antinocicepción periférica inducida por dichas neurohormonas, particularmente al establecer que la acción farmacológica puede llevarse a cabo a nivel periférico. Esto, sin embargo, no implica que los ganglios de la raíz dorsal no sean también un blanco terapéutico. Nuestra hipótesis es que a nivel periférico la OXT y la AVP tienen el potencial de actuar en distintos sitios, por distintos mecanismos y a través de la activación de ambos tipos de receptores OTR y V1aR. A pesar de esto, los datos obtenidos indican diferencias entre los efectos de los péptidos que deberán tomarse en cuenta para escalar eventualmente su uso terapéutico. En particular resultan notorios los potentes efectos sistémicos

inducidos por la administración sc de AVP, los cuales desincentivan la exploración de esta neurohormona como molécula antinociceptiva clínicamente relevante. Por último, la descripción de una nueva acción de la OXT y de la presencia del OTR en terminaciones nerviosas libres abre un nuevo panorama de preguntas de investigación que resultará interesante contestar, ¿cómo actúa la OXT para producir una antinocicepción duradera?, ¿a qué tipo de segundos mensajeros está acoplado el OTR periférico?. Finalmente, al momento de terminar la presente tesis el efecto terapéutico de la administración sc de OXT en los seres humanos se está evaluando. Los resultados de un ensayo clínico muestran que dicha intervención produce antinocicepción en pacientes anestesiados sujetos a una intervención quirúrgica.

11. Bibliografía

- Amri, E.Z. y Pisani, D.F. (2016). Control of bone and fat mass by oxytocin. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 28(2):95-104.
- Anderson, C.T. y Breen, P.H. (2000). Carbon dioxide kinetics and capnography during critical care. *Crit Care.* 4, 207–215.
- Andrews, J.S., Newton, B.A., Sahgal, A. (1983). The effects of vasopressin on positively rewarded responding and on locomotor activity in rats. *Neuropeptides* 4, 17–29.
- Arletti, R., Benelli, A., Bertolini, A. (1993). Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides.* 24(3):125-9.
- Arnold, A., Etgen, A., Fahrbach, S., Rubin, R., Pfaff, D. (2002). *Hormones, Brain and Behavior, Five-Volume Set.* Burlington: Elsevier, p.1611.
- Auböck, J. y Konzett, H. (1983). Ischemic pain versus mental task: Effect on plasma arginine vasopressin in man. *Pain* 15, 93–99.
- Ayar, A., Ozcan, M., Alcin, E., Serhatlioglu, I., Ozcan, S., Kutlu, S., Kelestimur, H. (2014). Oxytocin activates calcium signaling in rat sensory neurons through a protein kinase C-dependent mechanism. *J Physiol Biochem.* 70(1):43-8.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 139(2):267–284.
- Baylis, P.H. y Robertson, G.L. (1980). Plasma vasopressin response to hypertonic saline infusion to assess posterior pituitary function. *J R Soc Med.* 73(4):255-60.
- Benarroch, E.E. (2013). Oxytocin and vasopressin: social neuropeptides with complex neuromodulatory functions. *Neurology.* 80(16):1521-8.
- Berkowitz, B.A. y Sherman, S. (1982). Characterization of vasopressin analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 220, 329–334.
- Berntson, G.G. y Berson, B.S. (1980). Antinociceptive effects of intraventricular or systemic administration of vasopressin in the rat. *Life Sci.* 26(6):455-9.
- Berson, B.S., Berntson, G.G., Zipf, W., Torello, M.W., Kirk, W.T. (1983). Vasopressin-induced antinociception: An investigation into its physiological and hormonal basis. *Endocrinology* 113, 337–343.
- Bodnar R.J., Wallace M.M., Kordower J.H., Nilaver G., Cort J., Zimmerman E.A. (1982). Modulation of nociceptive thresholds by vasopressin in the Brattleboro and normal rat. *Ann N Y Acad Sci.* 394:735-9.
- Bodnar, R.J., Nilaver, G., Wallace, M.M., Badillo-Martinez, D., Zimmerman, E.A. (1984). Pain threshold changes in rats following central injection of beta-endorphin, met-enkephalin, vasopressin or oxytocin antisera. *Int J Neurosci.* 24(2):149-60.

- Bodnar, R.J., Truesdell, L.S., Nilaver, G. (1985). Potentiation of vasopressin analgesia in rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Peptides*. 6:621-6.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248–54.
- Breton, J.D., Veinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A.M., Freund-Mercier, M.J., Schlichter, R., Poisbeau, P. (2008). Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain*. 4:19.
- Buijs, R.M., Swaab, D.F., Dogterom, J., van Leeuwen, F.W. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res*. 186:423-33.
- Busnelli, M., Saulière, A., Manning, M., Bouvier, M., Galés, C., Chini, B. (2012). Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. *J Biol Chem*. 287:3617-29.
- Caldwell, J.D., Mason, G.A., Stanley, D.A., Jerdack, G., Hruby, V.J., Hill, P., Prange, A.J. Jr., Pedersen, C.A. (1987). Effects of nonapeptide antagonists on oxytocin- and arginine-vasopressin-induced analgesia in mice. *Regul Pept*. 18:233-41.
- Cartmell, S.M., Gelgor, L., Mitchell, D. (1991). A revised rotarod procedure for measuring the effect of antinociceptive drugs on motor function in the rat. *J Pharmacol Methods*. 26:149-59.
- Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Diez-Martínez, D.C., Rodríguez-Jiménez, J. (2012). Functional interactions between the paraventricular hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *Neuroscience*. 209:196-207.
- Condés-Lara, M., González, N.M., Martínez-Lorenzana, G., Delgado, O.L., Freund-Mercier, M.J. (2003). Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res*. 976:75-81.
- Condés-Lara, M., Maie, I.A., Dickenson, A.H. (2005). Oxytocin actions on afferent evoked spinal cord neuronal activities in neuropathic but not in normal rats. *Brain Res*. 1045:124-33.
- Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Rojas-Piloni, G. (2008). Paraventricular hypothalamic nucleus stimulation modulates nociceptive responses in dorsal horn wide dynamic range neurons. *Neurosci Lett*. 444(2):199-202.
- Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rojas-Piloni, G., Rodríguez-Jiménez, J. (2007). Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Res*. 1160:20-9.
- 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. *Neurosci Res*. 98:59-63.

- Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López Hidalgo, M., Freund-Mercier, M.J. (2006). Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res.* 1081:126-37.
- Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J. (2009). Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *Eur J Neurosci.* 30:1056-63.
- Deing, V., Roggenkamp, D., Kühnl, J., Gruschka, A., Stäb, F., Wenck, H., Bürkle, A., Neufang, G. (2013). Oxytocin modulates proliferation and stress responses of human skin cells: implications for atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 22:399-405.
- DeLaTorre, S., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Villanueva, L., Condés-Lara, M. (2009). Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: electrophysiological and behavioral evidence. *Pain.* 144:320-8.
- Denda, S., Takei, K., Kumamoto, J., Goto, M., Tsutsumi, M., Denda, M. (2012). Oxytocin is expressed in epidermal keratinocytes and released upon stimulation with adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate in vitro. *Exp Dermatol.* 7:535-7.
- Dubin, A.E. y Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 120:3760-72.
- Dworkin, B.R., Filewich, R.J., Miller, N.E., Craigmyle, N., Pickering, T.G. (1979). Baroreceptor activation reduces reactivity to noxious stimulation: implications for hypertension. *Science*, 205:1299-1301
- Eliava, M., Melchior, M., Knobloch-Bollmann, H.S., Wahis, J., da Silva Gouveia, M., et al. (2016). A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron.* 89:1291-1304.
- Ettenberg, A., van der Kooy, D., Le Moal, M., Koob, G.F., Bloom, F.E. (1983). Can aversive properties of (peripherally-injected) vasopressin account for its putative role in memory? *Behav Brain Res* 7, 331-350.
- Gao, L. y Yu, L.C. (2004). Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats. *Regul Pept.* 120:53-8
- García-Boll, E., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., González-Hernández A. (2018). Oxytocin inhibits the rat medullary dorsal horn Sp5c/C1 nociceptive transmission through OT but not V1A receptors. *Neuropharmacology.* 129:109-117.
- Ge, Y., Lundeberg, T., Yu, L.C. (2002) Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Res.* 927:204-7.
- Gimpl, G. y Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 81:629-83.

- Godínez-Chaparro, B., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Manzano-García, A., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M., González-Hernández, A. (2016). The potential role of serotonergic mechanisms in the spinal oxytocin-induced antinociception. *Neuropeptides*. 60:51-60.
- Gong, L., Gao, F., Li, J., Li, J., Yu, X., Ma, X., Zheng, W., Cui, S., Liu, K., Zhang, M., Kunze, W., Liu, C.Y. (2015). Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca(2+)/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience*. 289:417-28.
- González-Hernández, A., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M. (2014). Oxytocin and analgesia: future trends. *Trends Pharmacol Sci*. 35:549-51.
- González-Ramírez, R., Chen, Y., Liedtke, W.B., et al. TRP Channels and Pain. In: Emir TLR, editor. *Neurobiology of TRP Channels*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017. Chapter 8.
- Han, R.T., Kim, H.B., Kim, Y.B., Choi, K., Park, G.Y., et al. (2018). Oxytocin produces thermal analgesia via vasopressin-1a receptor by modulating TRPV1 and potassium conductance in the dorsal root ganglion neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*. 22:173-182.
- Hobo, S., Hayashida, K., Eisenach, J.C. (2012). Oxytocin inhibits the membrane depolarization-induced increase in intracellular calcium in capsaicin sensitive sensory neurons: a peripheral mechanism of analgesic action. *Anesth Analg*. 114:442-9.
- IASP Task Force. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) *Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy*, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, ©1994.
- Jiang, C.Y., Fujita, T., Kumamoto, E. (2014). Synaptic modulation and inward current produced by oxytocin in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *J Neurophysiol*. 111:991-1007
- Johnson, Z.V. y Young, L.J. (2017). Oxytocin and vasopressin neural networks: Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience. *Neurosci Biobehav Rev*. 76:87-98.
- Juif, P.E. y Poisbeau, P. (2013). Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain*. 154:1449-56.
- Kendler, K.S., Weitzman, R.E., Fisher, D.A. (1977). The effect of pain on plasma arginine vasopressin concentrations in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 8: 89–124.
- Kordower, J.H. y Bodnar, R.J. (1984). Vasopressin analgesia: specificity of action and non-opioid effects. *Peptides*. 5:747-56.
- Kordower, J.H., Sikorszky, V., Bodnar, R.J. (1982). Central antinociceptive effects of lysine-vasopressin and an analogue. *Peptides*. 3:613-7.
- Koshimizu, T.A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev*. 92:1813-64.

- Kress, M. y Kuner, R. (2009). Mode of action of cannabinoids on nociceptive nerve endings. *Exp Brain Res.* 196:79-88.
- Kubo, A., Shinoda, M., Katagiri, A., Takeda, M., Suzuki, T., Asaka, J., Yeomans, D.C., 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.
- Kucyi, A. y Davis, K.D. (2017). The Neural Code for Pain: From Single-Cell Electrophysiology to the Dynamic Pain Connectome. *Neuroscientist.* 23:397-414.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- László, F.A., László, F. Jr, De Wied, D. (1991). Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol Rev.* 43:73–108.
- Li, T., Wang, P., Wang, S.C., Wang, Y.F. (2017). Approaches Mediating Oxytocin Regulation of the Immune System. *Front Immunol.* 7:693.
- Martínez-Lorenzana, G., Espinosa-López, L., Carranza, M., Aramburo, C., Paz-Tres, C., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M. (2008). PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. *Pain.* 140:265-73.
- Matsuura, T., Kawasaki, M., Hashimoto, H., Yoshimura, M., Motojima, Y., Saito, R., Ueno, H., Maruyama, T., Ishikura, T., Sabanai, K., Mori, T., Ohnishi, H., Onaka, T., Sakai, A., Ueta, Y. (2016). Possible Involvement of the Rat Hypothalamo-Neurohypophysial/Spinal Oxytocinergic Pathways in Acute Nociceptive Responses. *J Neuroendocrinol.* 28(6).
- Mavani, G.P., DeVita, M.V., Michelis, M.F. (2015). A review of the nonpressor and nonantidiuretic actions of the hormone vasopressin. *Front Med (Lausanne).* 2:19.
- McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:13525-30.
- Millan, M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66:355-474.
- Miranda-Cardenas, Y., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López-Hidalgo, M., Freund-Mercier, M.J., 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(1-2):182-9.
- Mogil, J.S., Sorge, R.E., LaCroix-Fralish, M.L., Smith, S.B., Fortin, A., et al. (2011). Pain sensitivity and vasopressin analgesia are mediated by a gene-sex-environment interaction. *Nat Neurosci* 14, 1569–1573.
- Moreno-López, Y., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G. (2013). Identification of oxytocin receptor in the dorsal horn and nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Neuropeptides.* 47:117-23.

- Peng, F., Qu, Z.W., Qiu, C.Y., Liao, M., Hu, W.P. (2015). Spinal vasopressin alleviates formalin-induced nociception by enhancing GABAA receptor function in mice. *Neurosci Lett.* 593:61-5.
- Perl, E.R. (1968). Myelinated afferent fibres innervating the primate skin and their response to noxious stimuli. *J Physiol.* 197:593-615.
- Petersson, M., Wiberg, U., Lundeberg, T., Uvnäs-Moberg, K. (2001). Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides.* 22:1479-84.
- Qiu, F., Hu, W.P., Yang, Z.F. (2014a). Enhancement of GABA-activated currents by arginine vasopressin in rat dorsal root ganglion neurons. *Sheng Li Xue Bao* 66: 647–657.
- Qiu, F., Qiu, C.Y., Cai, H., Liu, T.T., Qu, Z.W., Yang, Z., Li, J.D., Zhou, Q.Y., Hu, W.P. (2014b). Oxytocin inhibits the activity of acid-sensing ion channels through the vasopressin, V1A receptor in primary sensory neurons. *Br J Pharmacol.* 171:3065-76.
- Raggenbass, M. (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol.* 583:243-54.
- Reeta, Kh., Mediratta, P.K., Rathi, N., Jain, H., Chugh, C., Sharma, K.K. (2006). Role of kappa- and delta-opioid receptors in the antinociceptive effect of oxytocin in formalin-induced pain response in mice. *Regul Pept.* 135:85-90.
- Robinson, D.A., Wei, F., Wang, G.D., Li, P., Kim, S.J., Vogt, S.K., Muglia, L.J., Zhuo, M. (2002). Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol.* 540(Pt 2):593-606.
- Rojas-Piloni, G., López-Hidalgo, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Condés-Lara, M. (2007). GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Res.* 1137:69-77.
- Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., DelaTorre, S., Condés-Lara, M. (2008). Nociceptive spinothalamic tract and postsynaptic dorsal column neurons are modulated by paraventricular hypothalamic activation. *Eur J Neurosci.* 28:546-58.
- Rojas-Piloni, G., Mejía-Rodríguez, R., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M. (2010). Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neurosci Lett.* 476:32-5.
- Rojas-Piloni, G., Rodríguez-Jiménez, J., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M. (2012). Dorsal horn antinociception mediated by the paraventricular hypothalamic nucleus and locus coeruleus: a comparative study. *Brain Res.* 1461:41-50.
- Rousselot, P., Papadopoulos, G., Merighi, A., Poulain, D.A., Theodosis, D.T. (1990). Oxytocinergic innervation of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Res.* 529:178-84.
- Russell, J.A. y Walley, K.R. (2010). Vasopressin and its immune effects in septic shock. *J Innate Immun.* 5:446–460.

- Sawchenko, P.E. y Swanson, L.W. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 205:260-72.
- Schorscher-Petcu, A., Sotocinal, S., Ciura, S., Dupré, A., Ritchie, J. et al. (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., Garcia, C., Lacour, C., Guiraudou, P., et al. (1993). Biochemical and pharmacological properties of SR49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J Clin Invest.* 92:224–231.
- Smith, C.J.W., DiBenedictis, B.T., Veenema, A.H. (2019). Comparing vasopressin and oxytocin fiber and receptor density patterns in the social behavior neural network: Implications for cross-system signaling. *Front Neuroendocrinol.* [Epub ahead of print]
- Sneddon, L.U. (2018). Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda);* 33:63-73.
- Snider, W.D. y McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron.* 20:629-32.
- Stein, C. (2016). Opioid Receptors. *Annu Rev Med.* 67:433-51.
- Stein, C., Lang, L.J. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 9:3-8.
- Stock, S.y Uvnäs-Moberg, K. (1988). Increased plasma levels of oxytocin in response to afferent electrical stimulation of the sciatic and vagal nerves and in response to touch and pinch in anaesthetized rats. *Acta Physiol Scand.* 132:29-34.
- Stoop, R. (2012). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron.* 76:142-59.
- Suzuki, H., Kawasaki, M., Ohnishi, H., Otsubo, H., Ohbuchi, T. et al. (2009). Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. *J Neurosci.* 29:13182–13189.
- Swanson, L.W. 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.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51:5-17.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:4350–4.
- Urch, C.E. y Dickenson, A.H. (2003). In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurones of rats. *Brain Res Brain Res Protoc.* 12:26-34.
- Uvnäs-Moberg, K., Bruzelius, G., Alster, P., Bileviciute, I., Lundeberg, T. (1992). Oxytocin increases and a specific oxytocin antagonist decreases pain threshold in male rats. *Acta Physiol Scand.* 144:487-8.

- Uvnäs-Moberg, K., Bruzelius, G., Alster, P., Lundeberg, T. (1993). The antinociceptive effect of non-noxious sensory stimulation is mediated partly through oxytocinergic mechanisms. *Acta Physiol Scand.* 149:199-204.
- Wang, L., Martínez, V., Larauche, M., Taché, Y. (2009). Proximal colon distension induces Fos expression in oxytocin-, vasopressin-, CRF- and catecholamines-containing neurons in rat brain. *Brain Res.* 1247:79-91.
- Watkins, L.R., Suberg, S.N., Thurston, C.L., Culhane, E.S. (1986). Role of spinal cord neuropeptides in pain sensitivity and analgesia: thyrotropin releasing hormone and vasopressin. *Brain Res.* 362:308-17.
- Wheeler-Aceto, H., Porreca, F., Cowan, A. (1990). The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain.* 40:229-38.
- Williams, P.D., Anderson, P.S., Ball, R.G., Bock, M.G., Carroll, L. et al. (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, nonpeptide oxytocin antagonist with potential utility for managing preterm labor. *J Med Chem* 37, 565–571.
- Xin, Q., Bai, B., Liu, W. (2017). The analgesic effects of oxytocin in the peripheral and central nervous system. *Neurochem Int.* 103:57-64.
- Xu, X.J. y Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994). Is systemically administered oxytocin an analgesic in rats? *Pain.* 57:193-6.
- Yang, J. (1994). Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine (Phila Pa 1976).* 19:867-71.
- Yang, J., Chen, J.M., Song, C.Y., Liu, W.Y., Wang, G., Wang, C.H., Lin, B.C. (2006a). Through the central V2, not V1 receptors influencing the endogenous opiate peptide system, arginine vasopressin, not oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus involves in the antinociception in the rat. *Brain Res.* 1069:127-38.
- Yang, J., Liu, W.Y., Song, C.Y., Lin, B.C. (2006b). Only arginine vasopressin, not oxytocin and endogenous opiate peptides, in hypothalamic paraventricular nucleus play a role in acupuncture analgesia in the rat. *Brain Res Bull.* 68:453-8.
- Yang, J., Liu, W.Y., Song, C.Y., Lin, B.C. (2006c). Through central arginine vasopressin, not oxytocin and endogenous opiate peptides, glutamate sodium induces hypothalamic paraventricular nucleus enhancing acupuncture analgesia in the rat. *Neurosci Res.* 54:49-56.
- Yang, J., Lu, L., Wang, H.C., Zhan, H.Q., Hai, G.F. et al. (2012). Effect of intranasal arginine vasopressin on human headache. *Peptides.* 38:100–104.
- Yang, Q., Wu, Z.Z., Li, X., Li, Z.W., Wei, J.B., Hu, Q.S. (2002). Modulation by oxytocin of ATP-activated currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology.* 43(5):910-6.

Yirmiya, R., Ben-Eliyahu, S., Shavit, Y., Marek, P., Liebeskind, J.C. (1990). Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res.* 537:169-74.

Zlokovic, B.V., Hyman, S., McComb, J.G., Lipovac, M.N., Tang, G., Davson, H. (1990). Kinetics of arginine-vasopressin uptake at the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta.* 27:191–198.

12. Publicaciones derivadas de la presente tesis.

Manzano-García A., González-Hernández A., Tello-García I.A., Martínez-Lorenzana G., Condés-Lara M. (2018). The role of peripheral vasopressin 1A and oxytocin receptors on the subcutaneous vasopressin antinociceptive effects. *Eur J Pain.* 22, 511-526.

González-Hernández A., Manzano-García A., Martínez-Lorenzana G., Tello-García I.A., Carranza M., Arámburo C., Condés-Lara M. (2017). Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons. *Pain.* 158, 2117-2128.

Otras publicaciones derivadas de la formación durante el Doctorado:

Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rojas-Piloni, G., Tello-García, I., Manzano-García, A., Rubio-Beltran, E., González-Hernández, A. (2018). Axons of individual dorsal horn neurons bifurcated to project in both the anterolateral and the postsynaptic dorsal column systems. *Neuroscience.* 371:178-190.

Gamal-Eltrabily, M. y Manzano-García, A. (2017). Role of central oxytocin and dopamine systems in nociception and their possible interactions: suggested hypotheses. *Rev.Neurosci.* 29:377-386

Manzano-García, A. y Gamal-Eltrabily, M. (2017). A new role of growth hormone and insulin growth factor receptor type 1 in neonatal inflammatory nociception. *Pain Reports.* 2: e608.

Condés-Lara, M., Zayas-González, H., Manzano-García, A., González-Hernández, A. (2016). Response to Letter to the Editor by Eisenach and Yaksh on "Successful Pain Management with Epidural Oxytocin". *CNS Neurosci Ther.* 22:867-8.

Godínez-Chaparro, B., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Manzano-García, A., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M., González-Hernández, A. (2016). The potential role of serotonergic mechanisms in the spinal oxytocin-induced antinociception. *Neuropeptides.* 60:51-60.

Condés-Lara, M., Zayas-González, H., Manzano-García, A., Córdova-Quiroz, E., Granados-Mortera, J., García-Cuevas, M., Morales-Gómez, J., González-Hernández, A. (2016). Successful Pain Management with Epidural Oxytocin. *CNS Neurosci Ther.* 22:532-4.

ORIGINAL ARTICLE

The role of peripheral vasopressin 1A and oxytocin receptors on the subcutaneous vasopressin antinociceptive effects

A. Manzano-García, A. González-Hernández, I.A. Tello-García, G. Martínez-Lorenzana, M. Condés-Lara

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

Correspondence

Miguel Condés-Lara
E-mail: condés@unam.mx

Funding sources and conflict of interest disclosure

This work was sponsored by grant (to M. Condés-Lara) PAPIIT-UNAM (Grant No. IN200415) and (to A. González-Hernández) PAPIIT-UNAM (Grant No. IA203117). A. Manzano-García is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship (597467) from CONACYT. I.A. Tello-García also is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM and received fellowship (414165) from CONACYT.

Conflicts of interest disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare

Accepted for publication

23 September 2017

doi:10.1002/ejp.1134

Abstract

Background: Vasopressin (AVP) seems to play a role as an antinociceptive neurohormone, but little is known about the peripheral site of action of its antinociceptive effects. Moreover, AVP can produce motor impairment that could be confused with behavioural antinociception. Finally, it is not clear which receptor is involved in the peripheral antinociceptive AVP effects.

Methods: In anaesthetized rats with end-tidal CO₂ monitoring, extracellular unitary recordings were performed, measuring the evoked activity mediated by A β -, A δ -, C-fibres and post-discharge. Behavioural nociception and motor impairment were evaluated under subcutaneous AVP (0.1–10 μ g) using formalin and rotarod tests. Selective antagonists to vasopressin (V_{1A}R) or oxytocin receptors (OTR) were used. Additionally, vasopressin and oxytocin receptors were explored immunohistochemically in skin tissues.

Results: Subcutaneous AVP (1 and 10 μ g/paw) induced antinociception and a transitory reduction of the end-tidal CO₂. The neuronal activity associated with A δ - and C-fibre activation was diminished, but no effect was observed on A β -fibres. AVP also reduced paw flinches in the formalin test and a transitory locomotor impairment was also found. The AVP-induced antinociception was blocked by the selective antagonist to V_{1A}R (SR49059) or OTR (L368,899). Immunohistochemical evidence of skin VP and OT receptors is given.

Conclusions: Subcutaneous AVP produces antinociception and behavioural analgesia. Both V_{1a} and OTR participate in those effects. Our findings suggest that antinociception could be produced in a local manner using a novel vasopressin receptor located in cutaneous sensorial fibres. Additionally, subcutaneous AVP also produces important systemic effects such as respiratory and locomotor impairment.

Significance: Our findings support that AVP produces peripheral antinociception and behavioural analgesia in a local manner; nevertheless, systemic effects are also presented. Additionally, this is the first detailed electrophysiological analysis of AVP antinociceptive action after subcutaneous administration. The results are reasonably explained by the demonstration of V_{1A}R and OTR in cutaneous fibres.

1. Introduction

Arginine-vasopressin (AVP), a neurohypophysial hormone well known for its effects on water

homeostasis and blood pressure regulation, has been implied as a potential peptide modulating nociception. In rodents, intracerebroventricular (Kordower

and Bodnar, 1984) and intrathecal (Thurston et al., 1988, 1992; Peng et al., 2015) AVP administration produces behavioural analgesia. Furthermore, a physiological antinociceptive participation of AVP has been suggested by the facts that the AVP-deficient Brattleboro rat strain has hyperalgesia and diminished stress-induced analgesia (Bodnar et al., 1982), and that the systemic hyperosmotic challenge, a model of physiological release of AVP, produces antinociception (Schorscher-Petcu et al., 2010). In this sense, normal AVP plasma concentrations in humans increase from ≈ 4 pg/mL to >13 pg/mL after hypertonic saline infusion (Baylis and Robertson, 1980). Importantly, painful stimuli produce an increment in plasma AVP in rodents (Suzuki et al., 2009) and humans (Kendler et al., 1977; Auböck and Konzett, 1983; Yang et al., 2012), reaching concentrations >25 pg/mL in the latter (Yang et al., 2012).

Systemic AVP (or analogue) administration produces antinociception in chemical, thermal, inflammatory and mechanical nociceptive tests (Berkowitz and Sherman, 1982; Berson et al., 1983; Schorscher-Petcu et al., 2010; Mogil et al., 2011). However, the site of the AVP antinociceptive action after its peripheral administration had not been explored. It has been suggested that AVP could act at dorsal root ganglion (DRG) neurons enhancing GABA_A currents (Qiu et al., 2014a). Recently, Qiu et al. (2014b) showed that subcutaneous AVP diminished the number of flinches induced by acetic acid, suggesting a peripheral local effect. Nevertheless, peripheral AVP administration produces motor impairment (Andrews et al., 1983; Ettenberg et al., 1983), but no information about locomotor effects in behavioural models of pain is available. Furthermore, considering that AVP can cross the blood–brain barrier (Zlokovic et al., 1990), the action site (peripheral vs. central) preceding systemic AVP administration remains ambiguous.

Although the consensus about the receptor involved in AVP-induced antinociception is related to activation of the vasopressin 1a receptor (V_{1A}R) (Schorscher-Petcu et al., 2010; Mogil et al., 2011; Qiu et al., 2014a,b), the role of cutaneous oxytocin receptors (OTR) (González-Hernández et al., 2017) cannot be excluded considering their similitudes (Chini and Manning, 2007). Therefore, the aim of this study was to (1) evaluate the existence of local antinociceptive effects induced by subcutaneous (s.c.) AVP administration, (2) evaluate the participation of V_{1A}R and OTR and (3) differentiate between antinociception and motor impairment. Consequently, we performed electrophysiological

recordings of wide dynamic range (WDR) neurons and used behavioural models of acute pain and locomotor function as well as selective high-affinity V_{1A}R (SR49059) (Serradeil-Le Gal et al., 1993) and OTR (L-368,899) (Williams et al., 1994) antagonists. Using these methods, we found that the s.c. administration of AVP has a local antinociceptive effect that is mainly mediated by V_{1A}R, but we also found OTR participation. In fact, we found V_{1A}R and OTR immunohistochemically positive cutaneous sensorial fibres that could explain our results. Furthermore, AVP produces an important respiratory and motor impairment.

2. Materials and methods

2.1 Experimental animals

Experiments were performed using male Wistar rats ($n = 105$ rats, 280–320 g). Animals were housed in individual cages in a climate-controlled room, with water and food *ad libitum* and a 12-hour light-dark cycle. All experiments were carried out in accordance with the International Association for the Study of Pain (IASP) Guidelines for the Use of Animals in Research (Zimmermann, 1983) and with the approval of the Bioethical Committee at the Instituto de Neurobiología (Bioethical Committee protocols numbers 008, 009 and 010).

2.2 Electrophysiological approach

2.2.1 Surgical procedure

The rats were anaesthetized with urethane (1.2 g/kg; intraperitoneal, i.p.). A tracheotomy was performed to provide artificial ventilation (55 strokes/min, containing two-thirds N₂O and one-third O₂) and to monitor end-tidal CO₂ (Capstar-100 CO₂ analyzer; CWI Inc., Ardmore PA, USA) during the experiment (depicted in Fig. 1A,B,F). The temperature was maintained at 38 °C using a circulating water pad system. The rats were secured in a stereotaxic frame and the lumbar vertebrae were fixed to a spinal frame to improve the stability of the preparation. A laminectomy was performed to expose L4–L6 spinal cord segments, and the dura was carefully removed.

2.2.2 Electrophysiological recordings

Extracellular single unit recordings from deep dorsal horn segments (depth 500–1000 μ m) were made using quartz platinum/tungsten microelectrodes

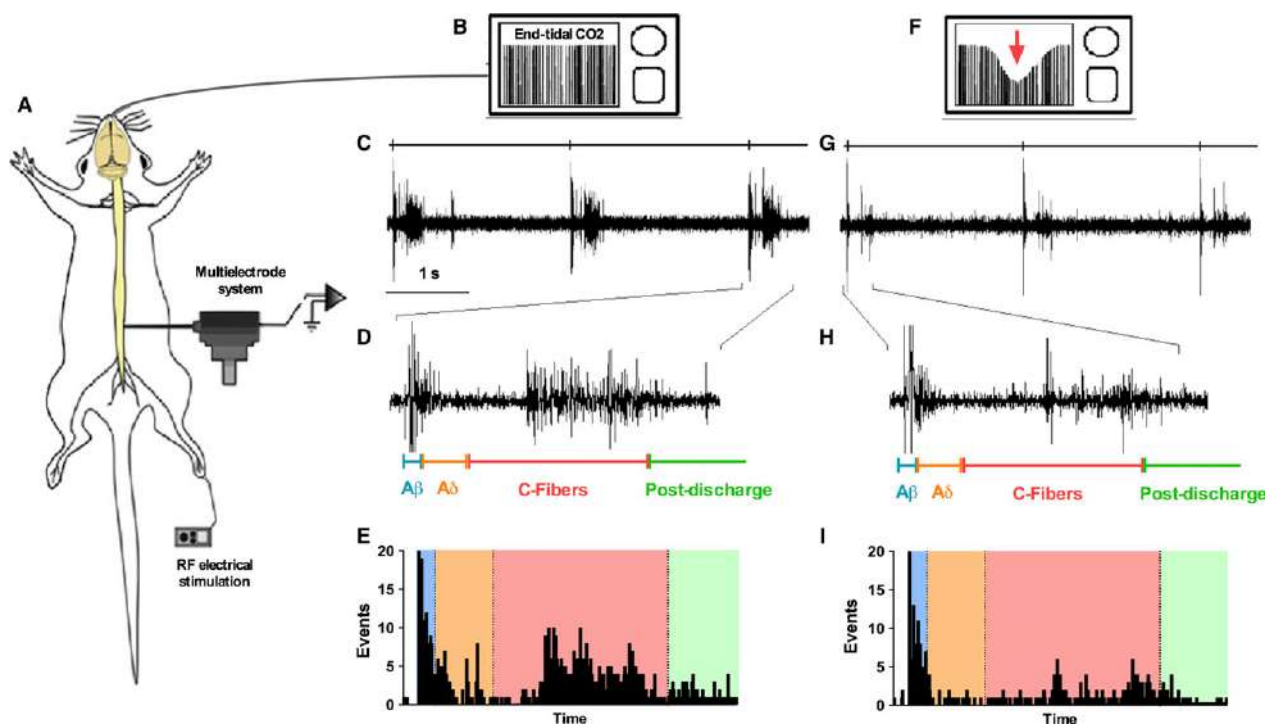


Figure 1 Spinal cord neuronal responses to the receptive field (rf) electrical stimulation. (A) Experimental set-up depicting the recording site at the spinal cord and the rf area of stimulation. (B) Represents the measurement of end-tidal CO₂ with a capnography monitor during the electrophysiological experiments. (C) Stimulus artefact and three responses of WDR spinal neurons after rf electrical stimulation. (D) Single response induced by rf electrical stimulation, and time latencies depicting the different fibre components. (E) Peristimulus time histogram obtained from 20 responses to rf electrical stimulation. (F) Depicts the acute reduction of end-tidal CO₂ 10 min after AVP (10 µg/50 µL) s.c. administration. (F, G, H, I) show the effect 40 min after AVP (10 µg/50 µL) s.c. administration in the rf. Notice the reduction of activity mediated by A δ - and C-fibres, and post-discharge.

(≈ 3 – 9 M Ω). Neuronal activity was recorded, amplified ($\times 1000$), filtered (300 Hz–3 KHz), digitalized and analysed using the Spike 2 system (CED, Cambridge, UK) (Fig. 1A,C,D,G,H). Recorded neurons received afferent input from the ipsilateral hind paw region, and the receptive field (RF) was found with non-noxious tactile stimulation (gentle tapping of the hind paw). Once a single-cell signal responsive to RF stimulation was located, two stainless stimulation electrodes (27 G) were inserted subcutaneously into the RF (Fig. 1A). Stimuli (1-ms pulses at 0.5 Hz; Grass S11 Stimulator) with increasing intensities were given to determine the threshold for activating A δ - and C-fibres (high threshold stimulation). Only cells that responded to both low and high threshold stimulation were used in this study; these cells are classified as wide dynamic range (WDR) neurons. Peristimulus time histograms (PSTH) were used to classify and quantify the evoked WDR neuronal responses according to the following stimulated fibre latencies: A β (0–20 ms), A δ (20–90 ms), C-fibres (90–300 ms) and post-discharge (300–800 ms) (Fig. 1E,I) (Urch and Dickenson, 2003).

2.2.3 Experimental design

Each peristimulus histogram was constructed with a series of 20 electrical pulses (1 ms, 0.5 Hz) at an intensity adjusted to 3 times the threshold required to evoke a C-fibre response. After 4 control series, each one separated by a 5-min interval, AVP (0.1, 1 or 10 µg/50 µL) was administered s.c. into the RF; then, stimulation was given at minutes 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 after AVP administration. To evaluate whether the pharmacological effect of AVP was local or systemic, AVP (10 µg/50 µL) was administered s.c. into the paw contralateral to the electrical stimulation in one group of rats. To test V_{1A}R or OTR participation in AVP effects, the specific antagonists SR49059 (10 µg/50 µL; V_{1A}R antagonist) or L-368,899 (10 µg/50 µL; OTR antagonist) were given s.c. in the RF 5 min prior to AVP, and then the aforementioned protocol was followed. As the doses used for the agonist and antagonist could change in their bioavailability and pharmacodynamics due to the subcutaneous administration, the selection followed literature references points (Serradeil-Le Gal

et al., 1993; Williams et al., 1994; Alexander et al., 2015). However, the AVP doses were 0.1, 1 and 10 to have a curve dose response.

2.3 Behavioural tests

2.3.1 Formalin-induced pain behaviour

Animals were habituated to the observation chamber for 30 min for 3 consecutive days prior to the experimental day. On the day of the test, the animals were placed in the observation chamber for 30 min, then AVP (0.1, 1 or 10 µg/50 µL) was injected s.c. into the dorsal surface of the right hind paw; 5 min later, formalin (50 µL of 1% formalin, diluted in saline) was injected s.c. into the same site as the AVP. The nociceptive behaviour (number of paw flinches or shakes) was quantified for 1 min every 5 min over the 60 min following formalin administration; this period was chosen to evaluate the three phases of the formalin test defined as follows: phase 1 (0:10 min), interphase (10:20 min) and phase 2 (20:60 min). To evaluate whether the pharmacological effect of AVP was local or systemic, AVP (10 µg/50 µL) was administered s.c. into the left hind paw (contralateral to the formalin administration) in one group of rats. In the groups with antagonists L-368,899 (100 µg/50 µL) or SR49059 (10 µg/50 µL), the antagonists were given s.c. injections 5 min prior to the AVP at the same site in the hind paw, and then the aforementioned protocol was followed.

2.3.2 Rotarod

A rotarod apparatus (IITC Inc. Life Science, CA, USA) was used to study the administration effects of AVP on locomotor function. The rotarod's velocity was set at 15 revolutions per minute (rpm) with a cut-off time of 180 s (drum diameter 9.52 cm). The rats were trained for 3 consecutive days (2 trainings per day). Training and experimental sessions consisted of 3 consecutive cycles of locomotion. In each cycle, the latency to fall from the rotarod was recorded and then averaged. After the training days, the same group of 9 rats was used for 21 days to evaluate the locomotor effect without treatment (control) and after the administration of saline (vehicle group), AVP (10 µg/50 µL) or OT (100 µg/50 µL). The drugs were injected s.c. into the dorsal surface of the hind paw 10 min prior to the rotarod test, with 24 h between the administration of each treatment.

2.4 Compounds

Apart from the anaesthetic (urethane), the drugs used were [Arg⁸]-vasopressin acetate salt (AVP); oxytocin (OT); (2*S*)-1-[[[(2*R*,3*S*)-5-Chloro-3-(2-chlorophenyl)-1-[(3,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-2,3-dihydro-3-hydroxy-1*H*-indol-2-yl]carbonyl]-2-pyrrolidinecarboxamide (SR49059) and (2*S*)-2-Amino-*N*-[(1*S*,2*S*,4*R*)-7,7-dimethyl-1-[[[4-(2-methylphenyl)-1-piperazinyl]sulfonyl]methyl]bicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-4-(methylsulfonyl)butanamide (L-368,899). All compounds were obtained from Sigma-Aldrich. AVP, OT and L-368,899 were dissolved in saline, whereas SR49059 was dissolved in DMSO (10%).

2.5 Data analysis

2.5.1 Electrophysiology

The mean number of action potentials evoked by peripheral stimuli in the four control series was set as 100% (we only used cells with less than a 10% variation in their activity during the control series). After drug administration, the number of action potentials was quantified in each series (from 0 to 60 min) and normalized compared to the control value. Throughout the experiment, the effect of AVP was evaluated globally as area under the curve (AUC, calculated with the trapezoid method) to unfold the time with the maximum response to AVP. Separate and global statistical comparisons were made between the effect of the different doses of AVP and the reversion by the antagonists. Only one unit was recorded for each animal. *Formalin test.* AUC constructed with the behavioural nociceptive response during phase 1, interphase and phase 2 was calculated. The statistical comparison between the effect of the different doses of AVP and the reversion by antagonists was done separately for each phase. *Rotarod.* The statistical comparison between the mean latencies to fall in each treatment and the control situation was conducted.

Figure data are presented as mean ± SEM (standard error of the mean). In all cases, statistical analysis was performed using GraphPad Prism[®] V6.01 software (La Jolla, CA, USA). Normal distribution was tested. In the electrophysiological experiments, a two-way repeated measures ANOVA was performed to analyse the effect of the treatments across the course of the experiment. One-way ANOVA was used to compare the global effect of different AVP doses and the participation of V_{1A}R and OTR in peripheral vasopressin effects in the electrophysiological and behavioural

models. Dunnett's post-hoc test was used to compare the treated groups versus the control groups. Tukey's post-hoc test was used when multiple comparisons were assessed. A probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The number of animals used in each experiment is reported in the results section.

2.6 Immunofluorescence for OTR and V_{1A}R

Three male Wistar rats (280–310 g) were prepared for an immunofluorescence of skin.

The animals were decapitated and immediately after, the lateral hairy skin areas were excised with a scalpel, snap-frozen in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc, Torrance, CA, USA), placed in liquid nitrogen-chilled isopentane and stored at -80°C before sectioning. A double immunofluorescence for OTR and V_{1A}R was performed on slide-mounted samples of 20- μm thick cryostat sections after fixation in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 10 min at room temperature. The sections were stored in four consecutive series. The first was used for immunofluorescence as follows: a primary antibody cocktail was used for 24 h at 4°C ; it included polyclonal antibodies against OTR (raised in goat, diluted 1:400, Cat.no. sc-8103; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) and V_{1A}R (raised in rabbit, diluted 1:300, Cat.no. A53272; Epigentek Group Inc, USA). The sections were washed for 5 min with 0.1M PBS and then incubated with the appropriate secondary antibody for 24 h at 4°C . The secondary antibodies used were donkey anti-Goat IgG (Alexa Fluor 488 conjugate, Cat.no. A-11055; Invitrogen, USA) and donkey anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 555 conjugate, Cat.no. A-31572; Invitrogen). The second series of sections was treated without the primary antibody as a negative control to avoid a possible false-positive staining. The two remaining series were stored for further analysis.

2.7 Confocal microscopy and image analysis

Confocal images of the lateral hairy skin were acquired using the LSM510 or LSM780 confocal microscope system (Zeiss, Mexico) with $25 \times /0.8$, $40 \times /1.3$ and $63 \times /1.32$ NA oil immersion objective, using the 488-nm argon laser to excite Alexa Fluor 488, and 561-nm diode laser for Alexa Fluor 555. The pinhole, Z-sectioning intervals were kept constant for all images. About 15–30 optical Z-sections of 0.5–1 μm thickness were obtained from the 20- μm thick tissue for each skin image stack.

Optical sections were acquired at a digital size of 1024×1024 pixels and averaged three times to reduce noise. In all cases, the image obtained was improved (brightness and gamma) and analysed using the ZEN 2 Blue Edition Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany). In addition, the colour for each channel was selected as follows: green for OTR and red for V_{1A}R. In all cases, a 2-dimensional projection image and a single optical section image (where the V_{1A}R and OTR signal were strong) were imported in Tag Image File Format (TIFF) and were used to compose the multi-panel figures. In addition, an orthogonal projection using four optical sections was performed.

3. Results

3.1 Electrophysiological approach

3.1.1 Effect of peripheral AVP administration on the afferent spinal cord activity

The electrophysiological recordings of spinal cord neuronal activity showed that the lowest dose of AVP (0.1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, $n = 6$ cells) did not change the neuronal activation evoked by A β -, A δ - and C-fibres nor did it change the post-discharge (Fig. 2). The intermediate AVP dose, 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ($n = 5$ cells), did not affect the activity mediated by A β -fibres (Fig. 2A,E,I). Nevertheless, this dose produced a statistically significant reduction in the neuronal activity mediated by A δ -fibres globally (Fig. 2F,J) and a non-significant reduction in the activity mediated by C-fibres (Fig. 2G,K). The peripheral administration of the highest dose of AVP (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, $n = 6$ cells) did not affect the activity mediated by A β -fibres (Fig. 2A,E,I), but it provoked a reduction in the activity evoked by A δ - (Fig. 2B,F,J) and C-fibres (Fig. 2C,G,K) throughout the experiment. A two-way ANOVA showed a significant reduction of A δ -mediated activity throughout the experiment, except 20 min after AVP administration, and a significant reduction of C-mediated activity starting on minute 20 (Fig. 2B,C) with the highest dose of AVP. In addition, this dose produced a global decrease in post-discharge (Fig. 2H,L) with a maximum effect 30 and 40 min after AVP administration (Fig. 2D). On the other hand, the administration of AVP (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, $n = 5$ cells) in the paw contralateral to the stimulated paw did not change the neuronal activation evoked by A β -, A δ - and C-fibres (Fig. 2E,F,G,H,I,J,K, L), but a non-significant reduction in post-discharge was observed.

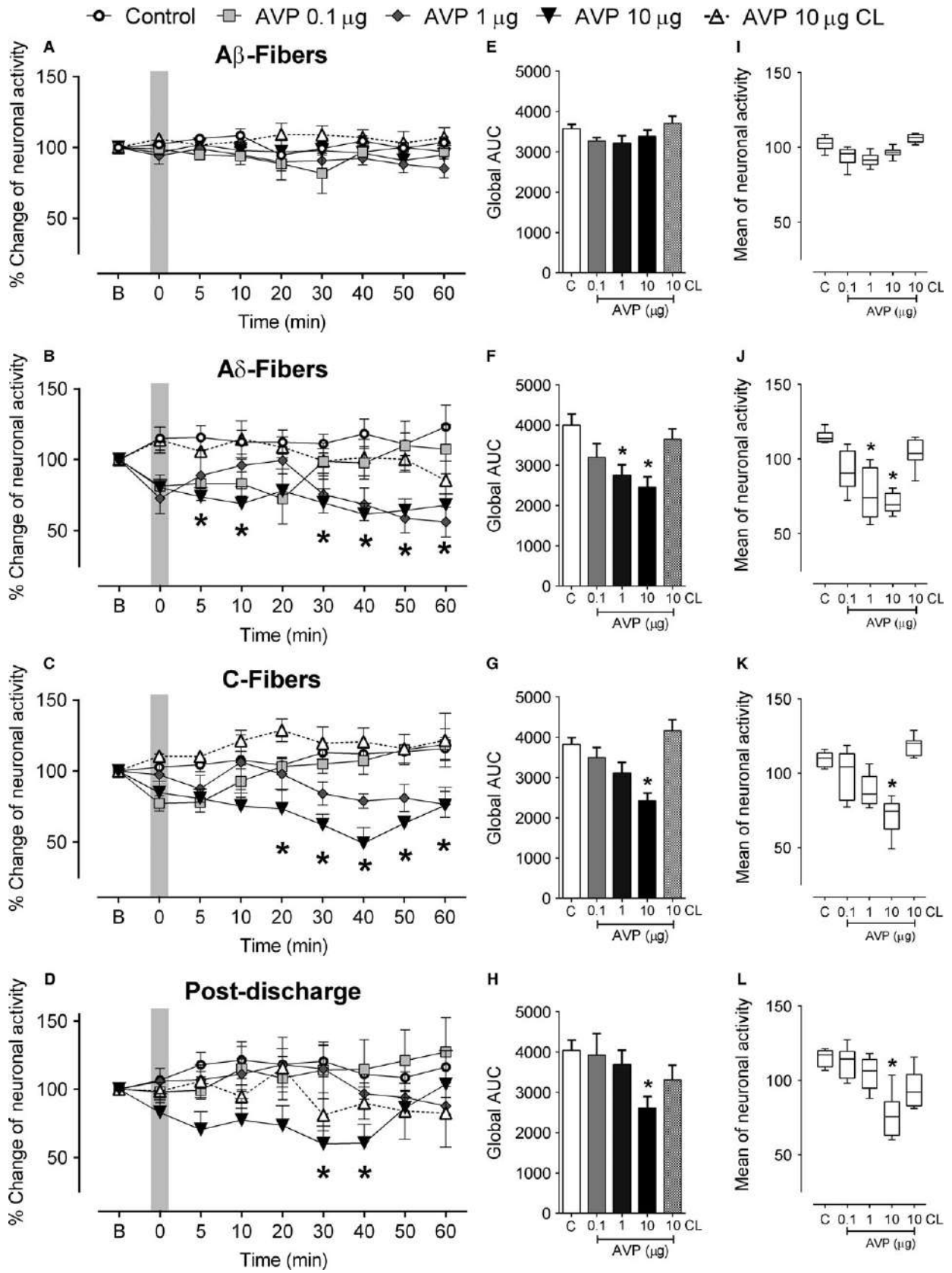


Figure 2 Effect of peripheral AVP administration on the afferent spinal cord activity. (A, B, C, D) graphs show the temporal course of the effects of peripheral AVP administration (dashed line) on the activity of spinal WDR neurons evoked by each type of fibre. * $p < 0.05$ represents the statistical difference between AVP (10 μg) and the control value at the same time (two-way ANOVA, Tukey's post-hoc test); for the sake of clarity, only the comparison of the maximum AVP dose is presented. (E, F, G, H) show the area under the curve (AUC) of the entire experiment for each treatment. (I, J, K, L) show the global data distribution for each dose. The boxes show the 95th and 5th percentiles, mean, and minimum and maximum values. Notice the inhibition of activity mediated by A δ - and C-fibres, and post-discharge by AVP (10 μg). * $p < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test. It is important to notice that AVP in doses of 10 μg applied in the contralateral (CL) paw produced no significant changes over the afferent activation.

3.1.2 Participation of V_{1A}R and OTR in the effect of peripheral AVP administration on the afferent spinal cord activity

In this set of experiments, we only used the AVP dose, which showed a significant reduction in the activity evoked by A δ - and C-fibres, and the post-discharge from the prior experiments (AVP 10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$). Local pretreatment with the specific V_{1A}R antagonist SR49059 (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, $n = 5$ cells) completely abolished the AVP-induced antinociception throughout the experiment (Figs. 3 and 4). A comparison between the effects of AVP and AVP plus SR

groups revealed a significant difference for A δ , C and post-discharge global activity (Fig. 4F,G,H). Additionally, a two-way ANOVA analysis showed that pretreatment with the V_{1A}R antagonist reverted the effect of AVP in every measurement during the experiment (Fig. 4A,B,C,D). On the other hand, local pretreatment with the specific OTR antagonist, L-368,899 (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, $n = 5$ cells), produced a partial reversion of the global AVP-induced antinociception. Statistical comparison did not show differences between the AVP plus L3 and control groups nor between the AVP plus L3 and AVP groups when global activity was compared (Fig. 5F,G,H).

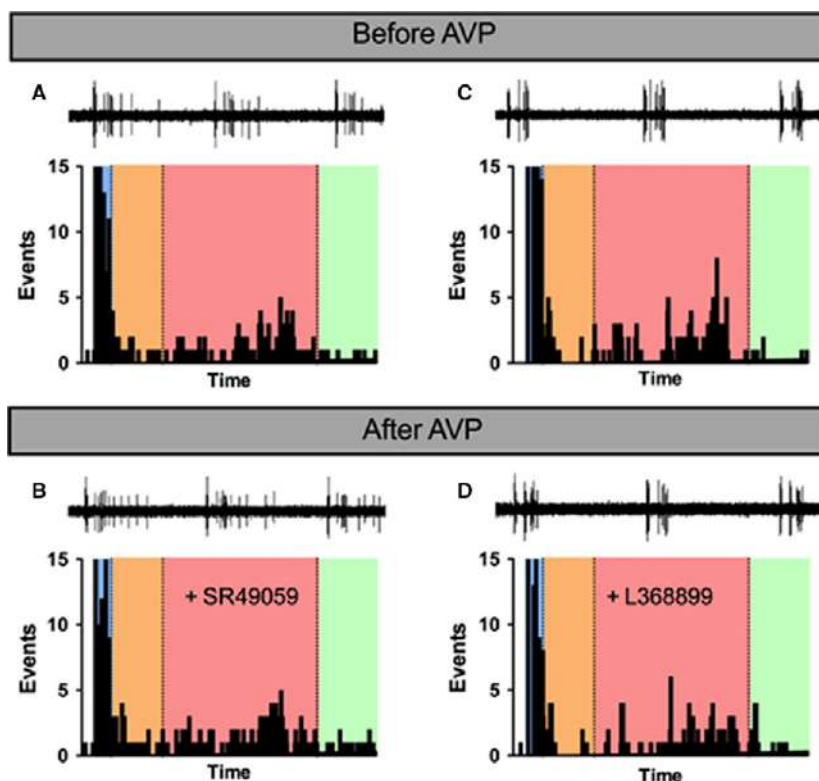


Figure 3 Effect of pretreatment with specific V_{1A}R and OTR antagonists on the AVP actions. (A, B) correspond to the same experiment. (A) Depicts three control responses of a WDR spinal neuron after receptive field (rf) electrical stimulation and a control peristimulus time histogram. (B) Represents the responses after 30 min of AVP administration and pretreatment with V_{1A}R antagonist SR49059. Notice the absence of AVP-induced reduction in A δ - and C-fibre-evoked activity. (C, D) correspond to the same experiment. (C) Depicts control responses and peristimulus time histogram. (D) Represents the responses after 30 min of AVP administration and pretreatment with OTR antagonist L368899. Notice the blockade of AVP reduction in A δ - and C-fibre-evoked activity.

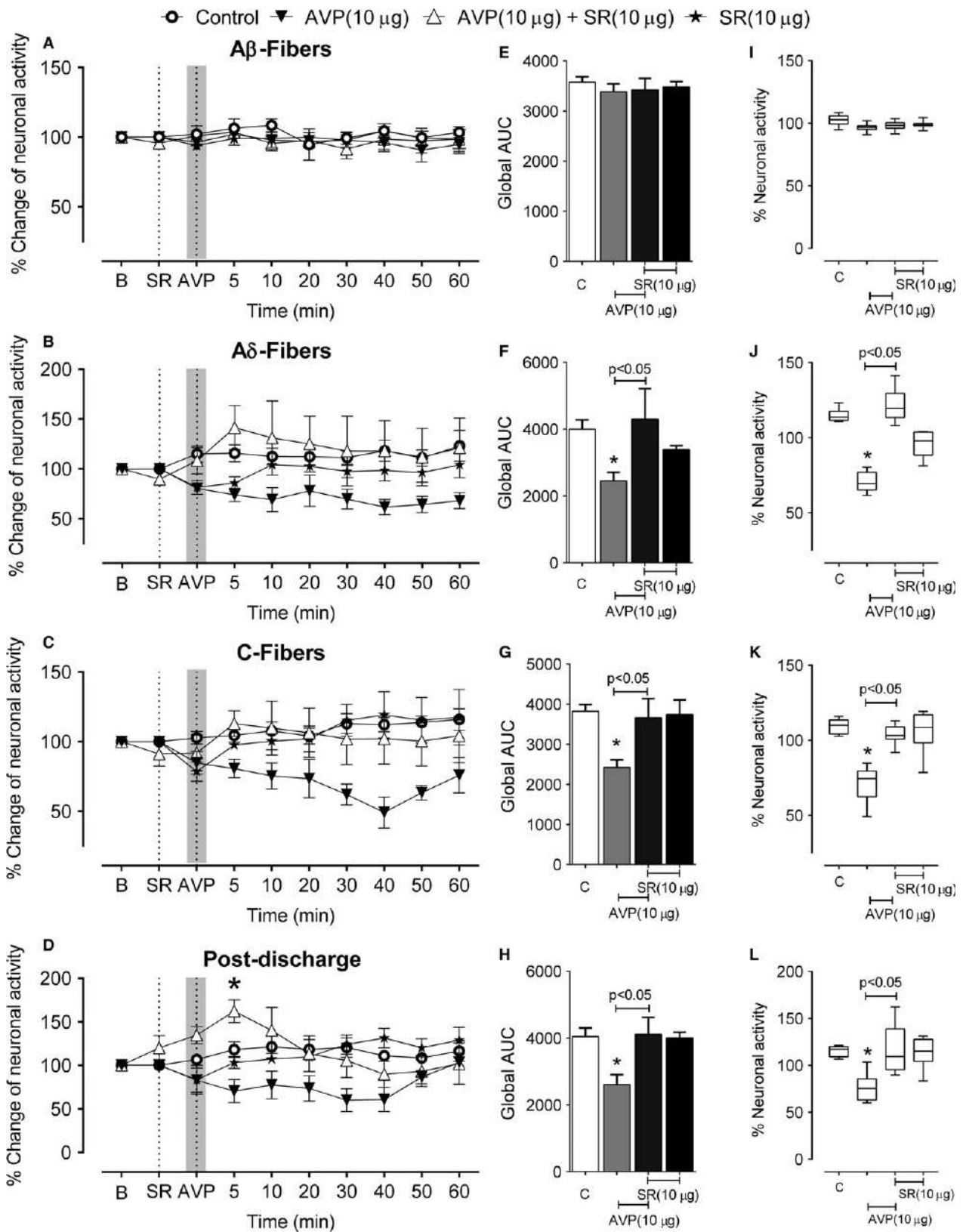


Figure 4 V1a receptor participation in the effects of peripheral AVP administration. (A, B, C, D) graphs show the temporal course of the effects of peripheral AVP (dashed line in darkened area) in animals pretreated with the V_{1A}R antagonist (SR49059) (dashed line). **p* < 0.05 represents the statistical difference between AVP (10 µg) + V_{1A}R antagonist (10 µg) compared with the control value at the same time (two-way ANOVA, Tukey's post-hoc test); for the sake of clarity, only the comparison of the AVP + V_{1A}R antagonist is presented. (E, F, G, H) show the area under the curve (AUC) of the entire experiment for each treatment. (I, J, K, L) show the global data distribution for each dose. The boxes show the 95th and 5th percentiles, mean, and minimum and maximum values. Notice the blockade produced by V_{1A}R antagonist over the response produced by peripheral AVP (10 µg). **p* < 0.05, one-way ANOVA, Tukey's post-hoc test.

Nevertheless, a two-way ANOVA analysis showed that pretreatment with OTR antagonist prevented the effect of AVP throughout the experiment, except for A δ activity 60 min after AVP administration (Fig. 5A,B,C,D). Neither V_{1A}R antagonist nor OTR antagonist administration produced an effect per se on A β -, A δ -, and C-fibres, and post-discharge evoked responses (*n* = 5, *n* = 6 cells per group, respectively) (Figs. 4 and 5).

3.2 Effect of peripheral AVP administration on end-tidal CO₂

As described in the Surgical Procedure section, end-tidal CO₂ was recorded during the electrophysiological experiments. After s.c. administration of AVP (1 and 10 µg/50 µL, *n* = 6 rats per group), we found a reduction in end-tidal CO₂ between minutes 5 and 20. This effect was not present after OT administration (31 µg/50 µL, *n* = 6 rats) (Fig. 6). S.c. preadministration of V_{1A}R (10 µg/50 µL, *n* = 5) and OTR (10 µg/50 µL, *n* = 6) antagonists did not prevent the end-tidal CO₂ reduction produced by AVP (data not shown).

3.3 Behavioural approach

3.3.1 Effect of peripheral AVP administration on formalin-induced pain behaviour

Peripheral administration of AVP (0.1 µg/50 µL, *n* = 6) failed to modify any of the three formalin test phases (Fig. 7A,B). AVP (1 µg/50 µL, *n* = 6) reduced the behavioural nociceptive response in phases 1 and 2 of the formalin test (Fig. 7A,B). AVP (10 µg/50 µL, *n* = 6) diminished the behavioural nociceptive response in all phases of the formalin test (phase 1, interphase and phase 2) (Fig. 7A,B). In contrast, the contralateral administration of AVP (10 µg/50 µL, *n* = 5) only diminished the behavioural nociceptive response in phase 1 and the interphase (Fig. 7A,B).

3.3.2 Participation of V_{1A}R and OTR in the effect of AVP in the formalin test

Local pretreatment with either the V_{1A}R antagonist SR49059 (10 µg/50 µL) or the OTR antagonist

L-368,899 (100 µg/50 µL) failed to modify the effect of AVP (10 µg/50 µL) in phase 1 and the interphase; however, both antagonists partially reverted phase 2 of the formalin test (*n* = 6 per group) (Fig. 7C,D). The sole administration of SR49059 (10 µg/50 µL, *n* = 7) provoked a statistically significant increment in the behavioural nociceptive responses during the interphase and phase 2 of the formalin test (Fig. 7C). The antagonist L-368,899 had no significant effects (Fig. 7D).

3.3.3 Effect of peripheral AVP and OT administration on locomotor function

The s.c. administration of AVP (10 µg/50 µL, *n* = 10 rats) produced locomotor impairment as shown by the decrease in latency to fall. Locomotor impairment was totally absent 1 h after AVP administration. In contrast, the administration of OT (100 µg/50 µL) did not produce motor impairment (Fig. 8).

3.4 V_{1A}R and OTR immunofluorescence

A double immunofluorescence technique against V_{1A}R and OTR was accomplished in the lateral hairy skin tissues. This technique allowed us to observe in the same tissue of both types of receptors. The presence of V_{1A}R was clearly detected in thin cutaneous fibres, and we confirmed the previous results of OTR fibres in the skin (González-Hernández et al., 2017). We tried to verify V_{1A}R and OTR co-localization using the orthogonal view tool since both receptors were very close to each other in several regions and samples of both receptors. However, we did not have any evidence of co-localization between the two receptors. Figure 9 illustrates an example of at least two parallel fibres, one with V_{1A}R and another with OTR.

4. Discussion

Taken together, these results show that s.c. AVP administration produces two discernible effects: (1) antinociception and behavioural analgesia; and (2) systemic responses (respiratory and locomotor impairment) that seem unrelated to antinociception but could temporarily predominate over the former.

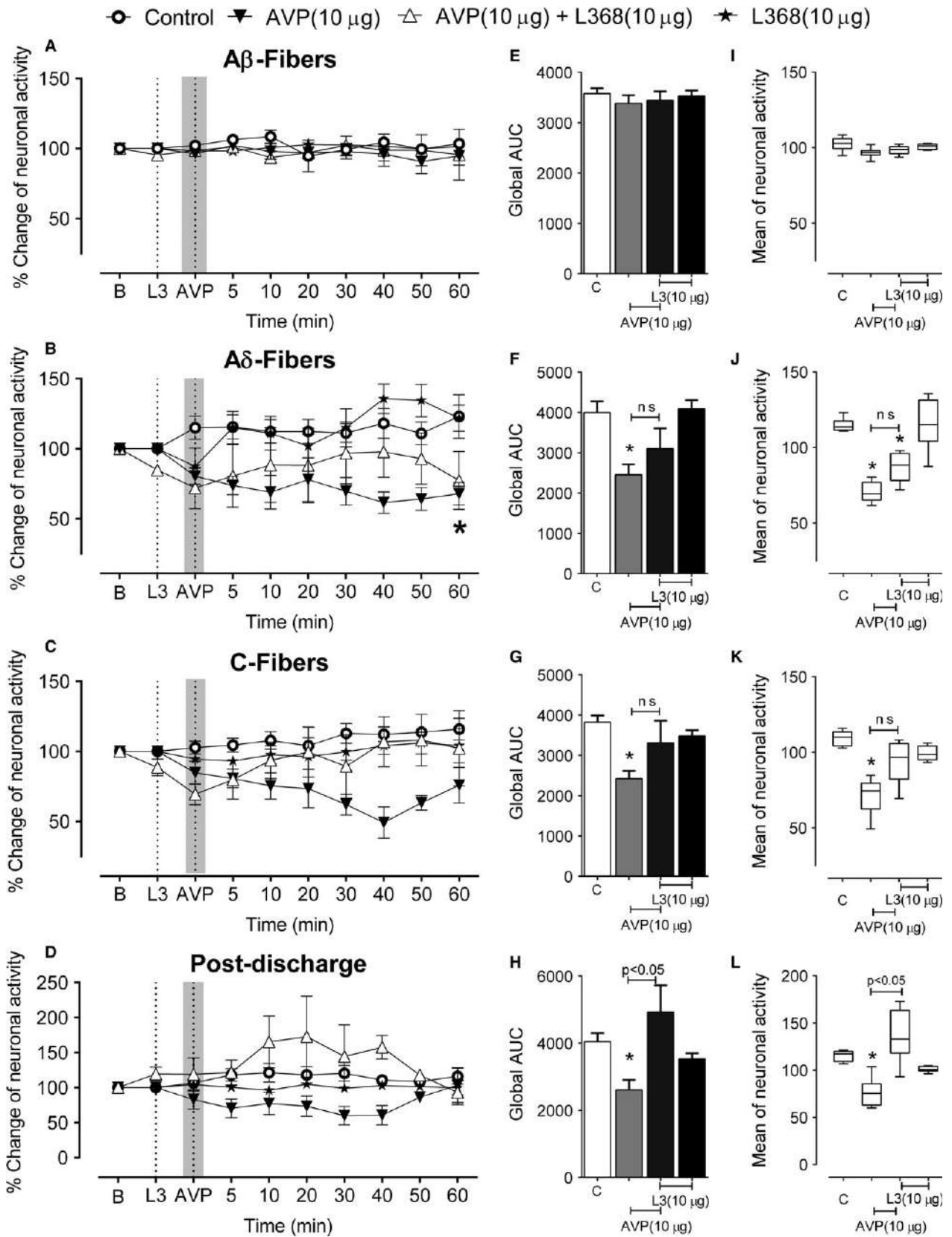


Figure 5 OT receptor participation in the effects of peripheral AVP administration. (A, B, C, D) Graphs showing the temporal course of the effects of peripheral AVP (dashed line in darkened area) in animals pretreated with the OTR antagonist (L368,899) (dashed line). Statistical difference between AVP (10 µg) + OTR antagonist (10 µg) compared with the control value at the same time (two-way ANOVA, Tukey's post-hoc test) was assessed. (E, F, G, H) show the area under the curve (AUC) of the entire experiment for each treatment. (I, J, K, L) show the global data distribution for each dose. The boxes show the 95th and 5th percentiles, mean, and minimum and maximum values. Notice the partial blockade produced by OTR antagonist over the response produced by peripheral AVP (10 µg) (F, J, G, K). * $p < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey's post-hoc test.

Finally, our findings could be mediated by the presence of $V_{1A}R$ and OTR in cutaneous fibres.

4.1 Antinociception induced by peripheral AVP administration

AVP as an antinociceptive molecule has been previously addressed (Berkowitz and Sherman, 1982; Berson et al., 1983; Schorscher-Petcu et al., 2010; Mogil et al., 2011; Qiu et al., 2014a,b). It was hypothesized that systemic AVP could produce peripheral antinociception by up-regulating the function of the $GABA_A$ receptor (Qiu et al., 2014a) or inhibiting acid-sensing ion channels in the DRG (Qiu et al., 2014b). To our knowledge, only one work previously addressed the possible peripheral local effect of AVP administration (Qiu et al., 2014b). Qiu et al. (2014b) described that OT and AVP produced local antinociception after intraplantar injection of acetic acid. In fact, using electrophysiological and behavioural approaches, our results show that sub-cutaneous AVP produces antinociception.

It is well accepted that A δ - and C-fibres of primary afferent carry the nociceptive information to the spinal cord, whereas A β -fibres preferentially transmit non-nociceptive information (Basbaum et al., 2009). Thus, the finding that s.c. AVP in the receptive field reduces the activity mediated by A δ - and C-fibres, but not by A β -fibres, is interpreted as a specific antinociceptive effect. However, it is

important to remark that only the s.c. administration in the receptive field had this effect, whereas the s.c. administration in the paw contralateral to the stimulated paw did not diminish the activity evoked by A δ - and C-fibres.

Subsequently, we studied whether this antinociceptive effect could transform into behavioural analgesia using the formalin test. Formalin administration produces paw shakes with three distinguishable phases (Barrot, 2012). Phase 1 (0–10 min), characterized by intense paw shakes, is possibly mediated by the activation of TRP channels (McNamara et al., 2007). The nociceptive behaviour diminishes during the interphase (10–20 min), but it is not known if this decrease is mediated by central modulation or by the absence of formalin activity (Matthies and Franklin, 1992; Fischer et al., 2014). Finally, phase 2 (20–60 min), characterized by the reappearance of nociceptive behaviour, is probably induced by peripheral inflammation and central sensitization (Hunskar and Hole, 1987). Considering that both ipsilateral (to the site of formalin application) and contralateral AVP administration (10 µg/50 µL) diminished the response in phase 1 and interphase, this effect could be correlated with the locomotor impairment observed and described elsewhere (Andrews et al., 1983; Ettenberg et al., 1983). However, only ipsilateral AVP administration produced an important reduction in nociceptive behaviour during phase 2 of the formalin test. In fact, our electrophysiological data show an early reduction of activity evoked by A δ -fibres starting 5 min after AVP administration followed by a reduction in C-fibres and post-discharge when applied only in the same paw where formalin was administered, so it is possible that an early local effect could be masked by the systemic response.

Additionally, it remains to be addressed whether AVP could participate in other mechanisms related to nociception. AVP has multiple anti-inflammatory effects (Russel and Walley, 2010) that could contribute to the reduction in the phase 2 of the formalin test described in this study. It is interesting to notice that $V_{1A}R$ knockout mice present an increased response in phase 2 of the formalin test (Schorscher-Petcu et al., 2010), which is consistent with our data when the $V_{1A}R$ antagonist alone incremented this phase.

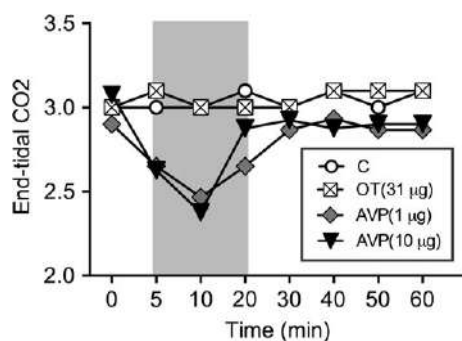


Figure 6 Effect of peripheral AVP administration on the end-tidal CO_2 . The graph shows the time course of end-tidal CO_2 after peripheral AVP administration. The grey area indicates the maximum decrease in end-tidal CO_2 after 1 and 10 µg AVP administration. Notice that OT does not produce this effect.

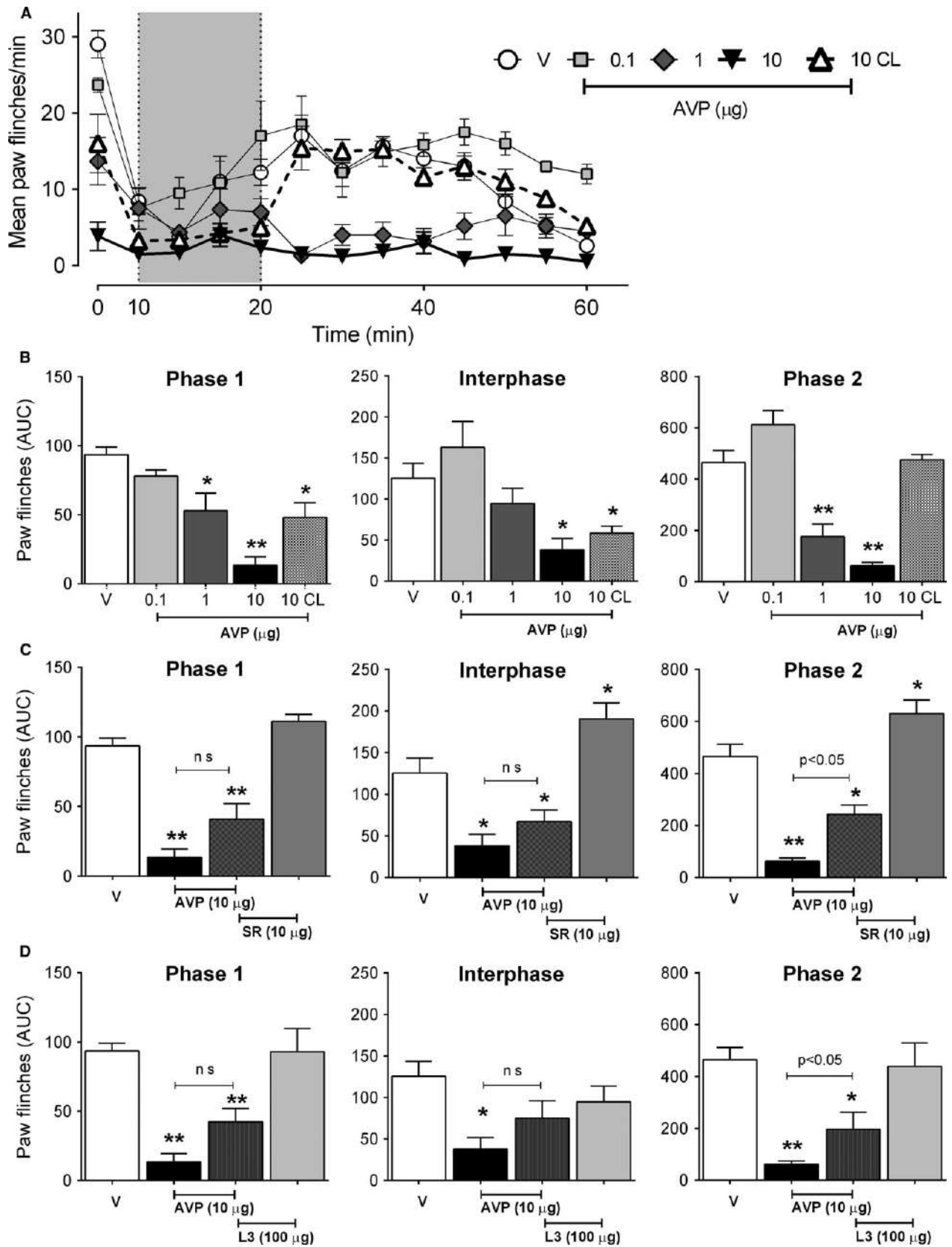


Figure 7 Effect of peripheral AVP on the formalin nociceptive-evoked response. (A) Time course of formalin paw flinches after the administration of AVP at different doses. The grey area represents the interphase between the two formalin-evoked responses. Notice the absence of flinch responses produced by ipsilateral 10 µg compared with the contralateral 10 µg of AVP during phase 2 of the formalin test. (B) Area under the curve (AUC) quantification of AVP effect on the formalin response throughout the different phases: phase 1 (0–10 min), interphase (10–20 min) and phase 2 (20–60 min). (C) AUC analysis showed the participation of V1a receptor in the effect of peripheral AVP in the formalin test. (D) Shows the participation of OT receptor in the effect of peripheral AVP in the formalin test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ one-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test for B, Tukey's post-hoc test for C and D.

4.2 Participation and location of V_{1A}R and OTR in the antinociceptive effects of peripheral AVP

AVP (Peng et al., 2015) and OT produce central (Condés-Lara et al., 2008; DeLaTorre et al., 2009) and peripheral (Hobo et al., 2012; Qiu et al., 2014b) antinociception; however, the receptor involved in those effects is still a matter of debate (González-Hernández et al., 2014). In this regard, administration of AVP or OT in V_{1A}R knockout mice failed to evoke behavioural analgesia (Schorscher-Petcu et al., 2010; Mogil et al., 2011; Qiu et al., 2014b). Nevertheless, there is evidence of OTR participation in central (Miranda-Cardenas et al., 2006) and peripheral (Juif and Poisbeau, 2013; Gong et al., 2015) antinociception. We found that both receptors seem to be implicated in peripheral AVP antinociception. Owing to the highly similar structure of AVP and OT, the former could bind with similar affinity to V1a and OT receptors in *in vitro* experiments (Manning et al., 2008). Consequently, we used two high-affinity, non-peptide antagonists to study the participation of both receptors (Serradeil-Le Gal et al., 1993; Williams et al., 1994). In our electrophysiological approach, the AVP-induced antinociception appears to be preferentially mediated by V_{1A}R although OTR also participates. Similarly, both antagonists partially blockade the antinociceptive effect of AVP in phase 2 of the formalin test. It is possible that a complete reversion did not occur with either antagonist because of the multiple nociceptive

factors involved in this behavioural test; for example, the numerous peripheral inflammatory mediators (Shibata et al., 1989) and central sensitization mechanisms (Tjølsen et al., 1992). Our immunohistochemical results demonstrated that peripheral OTR and V_{1A}R are present and that AVP could participate using both receptors due to the lack of total reversion with the specific antagonists. Nevertheless, we never used both antagonists simultaneously.

In DRG, V_{1A}R mRNA is markedly expressed in small and medium-diameter cells (Schorscher-Petcu et al., 2010), whereas OTR has been found co-localizing with both IB4 and CGRP (Moreno-López et al., 2013; Gong et al., 2015). OTR and V_{1A}R seem to be located in very close proximity, but we could not specify if they co-localized or only co-existed. Our results confirmed the existence of OTR in peptidergic peripheral nerve terminals (González-Hernández et al., 2017) and revealed the presence of V_{1A}R in peripheral fibres.

4.3 Systemic versus local AVP effects

Systemic effects of AVP considered the transitory diminution of end-tidal CO₂ and the locomotor impairment.

4.3.1 End-tidal CO₂

Systemic AVP produces vasoconstriction, preferentially in non-vital organs (László et al., 1991). Our

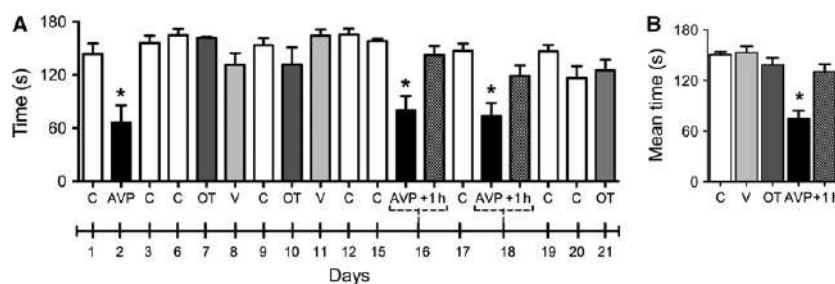


Figure 8 Locomotor effects induced by peripheral AVP administration. (A, B) Shows the effects on a motor function studied with the rotarod test. (A) Course over 21 days of the motor effects induced by AVP administration (10 µg), OT (100 µg), vehicle (V-saline) or control (C) measurements. AVP+1 h represents the effect on motor function 1 h after AVP administration. In (B), the mean time of the different treatments along the days is presented. * $p < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test.

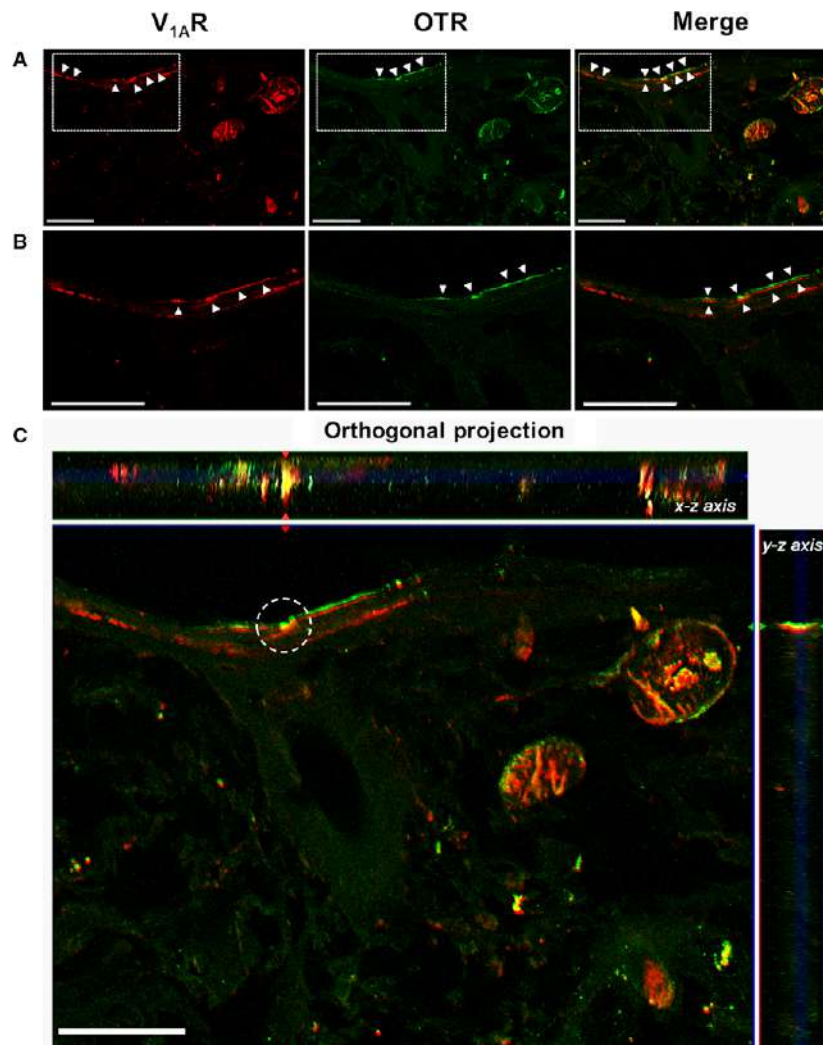


Figure 9 Representative confocal image of a skin (dermis and epidermis) section for $V_{1A}R$ and OTR immunofluorescence. The images are double-labelled sections of dermis and epidermis with antibodies against $V_{1A}R$ (red) and OTR (green) in the lateral hairy skin paw. The arrows show the site where $V_{1A}R$ and OTR are preferentially present in the dermis/epidermis. Panels in A are the z-stack projection from 4 optical sections ($25\times/0.8$ NA objectives). Panels in B are a single optical section cropped from panels A (from the box) showing that $V_{1A}R$ and OTR signals are near but not co-localized; the optical section was selected at the point with the best signal for $V_{1A}R$ and OTR. Panel C shows an orthogonal view displaying four optical sections at $25\times/1.3$ NA; y-z plane and x-z plane show no co-localization between $V_{1A}R$ and OTR. Scale bars: 50 μ m.

finding of end-tidal CO_2 reduction could be explained by a transitory hypoperfusion in non-vital vascular beds and a subsequent diminished transport of CO_2 from the periphery to the lungs (Anderson and Breen, 2000). On this subject, although the relation of a hypertensive response to AVP and antinociception was not approached in the current study, previous studies have explored this possibility and have not found a correlation between pressor and analgesic effects of AVP (Berkowitz and Sherman, 1982; Berson et al., 1983).

4.3.2 Locomotor impairment

It has been reported that the systemic AVP can produce locomotor impairment (Andrews et al., 1983; Ettenberg et al., 1983) and this effect can be confused with antinociception, when nociceptive behaviour is estimated as motor responses (Cartmell et al., 1991). We confirmed the AVP induced locomotor impairment with the rotarod test. This transitory effect could have a role in the diminish of phase 1 and interphase of the formalin test by both ipsi and contralateral AVP administration. Nonetheless,

during phase 2 only ipsilateral AVP produced behavioural antinociception, suggesting that this is a local effect unrelated to locomotor function.

4.3.3 Central versus peripheral AVP antinociceptive effects

AVP has multiple antinociceptive actions in the central nervous system. Microinjection of AVP in the nucleus raphe magnus (Yang et al., 2006b), caudate nucleus (Yang et al., 2006a) and spinal cord (Peng et al., 2015) produces antinociception. The participation of opiate and serotonin systems in AVP central antinociception has also been reported (Yang et al., 2009). Additionally, it is possible that circulating AVP could cross the blood–brain barrier (Zlokovic et al., 1990). Although the participation of central effects after peripheral AVP administration could not be explored in this study, it is unlikely that they play a major role in our results on the antinociceptive effect. Indeed, Rojas-Piloni et al. (2010) used a similar electrophysiological model and reported that spinal AVP microinjection did not diminish the responses evoked by A δ - and C-fibres. On the other hand, in the current study, the contralateral (to electrical stimuli and to formalin) administration of AVP neither diminished the activity mediated by A δ - and C-fibres nor produced the behavioural antinociceptive effect during phase 2 of the formalin test. Consequently, the presence of a V_{1A}R in the periphery seems to be responsible for the AVP action.

5. Conclusion

Subcutaneous AVP diminished the evoked activity mediated by A δ - and C- fibres and produced behavioural antinociception with V_{1A}R and OTR implications. The immunohistochemical location of V_{1A}R and OTR in cutaneous fibres suggests their mediation in the local effects. However, subcutaneous AVP administration produces respiratory CO₂ decrement and locomotor impairment that could be confused with antinociception.

Acknowledgements

Thanks are due to Jessica González Norris for reviewing the grammatical aspects of this paper, to Dr. Daisy Gasca-Martínez for her technical assistance with the rotarod test, to Elsa Nydia Hernández Ríos for her technical assistance in confocal microscopy and to Dr. Michael C. Jeziorski for his aid during the drafting.

Author contributions

A.M.G. contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data and participated in drafting the manuscript. A.G.H. contributed to the conception and design of the study; to the acquisition, analysis and interpretation of data; and participated in drafting the manuscript. I.A.T.G. contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data. G.M.L. contributed to the design of the study and to the analysis and interpretation of data. M.C.L. guided the research group, contributed to both the conception and the design of the study; to the analysis and interpretation of data; and participated in drafting and finalizing the manuscript. All authors participated in a critical review of the final manuscript.

References

- Alexander, S.P.H., Davenport, A.P., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J.A. et al. (2015). The concise guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 172, 5744–5869.
- Anderson, C.T., Breen, P.H. (2000). Carbon dioxide kinetics and capnography during critical care. *Crit Care* 4, 207–215.
- Andrews, J.S., Newton, B.A., Sahgal, A. (1983). The effects of vasopressin on positively rewarded responding and on locomotor activity in rats. *Neuropeptides* 4, 17–29.
- Auböck, J., Konzett, H. (1983). Ischemic pain versus mental task: Effect on plasma arginine vasopressin in man. *Pain* 15, 93–99.
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211, 39–50.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284.
- Baylis, P.H., Robertson, G.L. (1980). Plasma vasopressin response to hypertonic saline infusion to assess posterior pituitary function. *J R Soc Med* 73, 255–260.
- Berkowitz, B.A., Sherman, S. (1982). Characterization of vasopressin analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 220, 329–334.
- Berson, B.S., Bernston, G.G., Zipf, W., Torello, M.W., Kirk, W.T. (1983). Vasopressin-induced antinociception: An investigation into its physiological and hormonal basis. *Endocrinology* 113, 337–343.
- Bodnar, R.J., Wallace, M.M., Kordower, J.H., Nilaver, G., Cort, J., Zimmerman, E.A. (1982). Modulation of nociceptive thresholds by vasopressin in the Brattleboro and normal rat. *Ann N Y Acad Sci* 394, 735–739.
- Cartmell, S.M., Gelgor, L., Mitchell, D. (1991). A revised rotarod procedure for measuring the effect of antinociceptive drugs on motor function in the rat. *J Pharmacol Meth* 26, 149–159.
- Chini, B., Manning, M. (2007). Agonist selectivity in the oxytocin/vasopressin receptor family: New insights and challenges. *Biochem Soc Trans* 35, 737–741.
- Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Rojas-Piloni, G. (2008). Paraventricular hypothalamic nucleus stimulation modulates nociceptive responses in dorsal horn wide dynamic range neurons. *Neurosci Lett* 444, 199–202.
- DeLaTorre, S., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., Villanueva, L., Condés-Lara, M. (2009). Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: Electrophysiological and behavioral evidence. *Pain* 144, 320–328.
- Ettenberg, A., van der Kooy, D., Le Moal, M., Koob, G.F., Bloom, F.E. (1983). Can aversive properties of (peripherally-injected) vasopressin account for its putative role in memory? *Behav Brain Res* 7, 331–350.
- Fischer, M., Carli, G., Raboisson, P., Reeh, P. (2014). The interphase of the formalin test. *Pain* 155, 511–521.
- Gong, L., Gao, F., Li, J., Li, J., Yu, X. et al. (2015). Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia

- neurons mediated by Ca(2+)/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience* 289, 417–428.
- González-Hernández, A., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M. (2014). Oxytocin and analgesia: Future trends. *Trends Pharmacol Sci* 35, 549–551.
- González-Hernández, A., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Tello-García, I.A., Carranza, M., Arámburo, C. and Condés-Lara, M. (2017). Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons. *Pain* 158, 2117–2128.
- Hobo, S., Hayashida, K., Eisenach, J.C. (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.
- Hunnskaar, S., Hole, K. (1987). The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Juif, P.E., Poisbeau, P. (2013). Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain* 154, 1449–1456.
- Kendler, K.S., Weitzman, R.E., Fisher, D.A. (1977). The effect of pain on plasma arginine vasopressin concentrations in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 8, 89–124.
- Kordower, J.H., Bodnar, R.J. (1984). Vasopressin analgesia: Specificity of action and non-opioid effects. *Peptides* 5, 747–756.
- László, F.A., László, F. Jr, De Wied, D. (1991). Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol Rev* 43, 73–108.
- Manning, M., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B., Guillon, G. (2008). Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: Research tools and potential therapeutic agents. *Prog Brain Res* 170, 473–512.
- Matthies, B.K., Franklin, K.B. (1992). Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain* 51, 199–206.
- McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L. et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13525–13530.
- Miranda-Cardenas, Y., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López-Hidalgo, M., Freund-Mercier, M.J., 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.
- Mogil, J.S., Sorge, R.E., LaCroix-Fralish, M.L., Smith, S.B., Fortin, A. et al. (2011). Pain sensitivity and vasopressin analgesia are mediated by a gene-sex-environment interaction. *Nat Neurosci* 14, 1569–1573.
- Moreno-López, Y., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G. (2013). Identification of oxytocin receptor in the dorsal horn and nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Neuropeptides* 47, 117–123.
- Peng, F., Qu, Z.W., Qiu, C.Y., Liao, M., Hu, W.P. (2015). Spinal vasopressin alleviates formalin-induced nociception by enhancing GABAA receptor function in mice. *Neurosci Lett* 593, 61–65.
- Qiu, F., Hu, W.P., Yang, Z.F. (2014a). Enhancement of GABA-activated currents by arginine vasopressin in rat dorsal root ganglion neurons. *Sheng Li Xue Bao* 66, 647–657.
- Qiu, F., Qiu, C.Y., Cai, H., Liu, T.T., Qu, Z.W. et al. (2014b). Oxytocin inhibits the activity of acid-sensing ion channels through the vasopressin, V1A receptor in primary sensory neurons. *Br J Pharmacol* 171, 3065–3076.
- Rojas-Piloni, G., Mejía-Rodríguez, R., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M. (2010). Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 476, 32–35.
- Russell, J.A., Walley, K.R. (2010). Vasopressin and its immune effects in septic shock. *J Innate Immun* 5, 446–460.
- Schorscher-Petcu, A., Sotocinal, S., Ciura, S., Dupré, A., Ritchie, J. et al. (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., Garcia, C., Lacour, C., Guiraudou, P. et al. (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.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. (1989). Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347–352.
- Suzuki, H., Kawasaki, M., Ohnishi, H., Otsubo, H., Ohbuchi, T. et al. (2009). Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. *J Neurosci* 29, 13182–13189.
- Thurston, C.L., Culhane, E.S., Suberg, S.N., Carstens, E., Watkins, L.R. (1988). Antinociception vs motor effects of intrathecal vasopressin as measured by four pain tests. *Brain Res* 463, 1–11.
- Thurston, C.L., Campbell, I.A., Culhane, E.S., Carstens, E., Watkins, L.R. (1992). Characterization of intrathecal vasopressin-induced antinociception, scratching behavior, and motor suppression. *Peptides* 13, 17–25.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. (1992). The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.
- Urch, C.E., Dickenson, A.H. (2003). In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurones of rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 12, 26–34.
- Williams, P.D., Anderson, P.S., Ball, R.G., Bock, M.G., Carroll, L. et al. (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.
- Yang, J., Chen, J.M., Liu, W.Y., Song, C.Y., Wang, C.H., Lin, B.C. (2006a). Arginine vasopressin in the caudate nucleus plays an antinociceptive role in the rat. *Life Sci* 79, 2086–2090.
- Yang, J., Chen, J.M., Liu, W.Y., Song, C.Y., Wang, C.H., Lin, B.C. (2006b). Effect of arginine vasopressin in the nucleus raphe magnus on antinociception in the rat. *Peptides* 27, 2224–2229.
- Yang, J., Yuan, H., Chu, J., Yang, Y., Xu, H., Wang, G., Liu, W.Y., Lin, B.C. (2009). Arginine vasopressin antinociception in the rat nucleus raphe magnus is involved in the endogenous opiate peptide and serotonin system. *Peptides* 30, 1355–1361.
- Yang, J., Lu, L., Wang, H.C., Zhan, H.Q., Hai, G.F. et al. (2012). Effect of intranasal arginine vasopressin on human headache. *Peptides* 38, 100–104.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.
- Zlokovic, B.V., Hyman, S., McComb, J.G., Lipovac, M.N., Tang, G., Davson, H. (1990). Kinetics of arginine-vasopressin uptake at the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta* 27, 191–198.



Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons

Abimael González-Hernández^a, Alfredo Manzano-García^a, Guadalupe Martínez-Lorenzana^a, Irma A. Tello-García^a, Martha Carranza^b, Carlos Arámburo^b, Miguel Condés-Lara^{a,*}

Abstract

Oxytocin (OT) has emerged as a mediator of endogenous analgesia in behavioral and electrophysiological experiments. In fact, OT receptors (OTRs) in the spinal dorsal horn participate in a selective inhibition of the neuronal activity mediated by A δ and C fibers but not A β fibers. This study shows that OTRs are expressed in the terminal nerve endings and are able to inhibit nociceptive neuronal firing. Indeed, local peripheral OT blocked the first sensorial activity of A δ and C fibers recorded in the spinal cord neurons. Furthermore, using the formalin behavioral nociceptive test, we demonstrated that only ipsilateral OTR activation inhibits pain behavior. Our data are reinforced by the fact that the OTR protein is expressed in the sciatic nerve. Consistent with this, immunofluorescence of primary afferent fibers suggest that OTRs could be located in nociceptive-specific terminals of the skin. Taken together, our results suggest that OTRs could be found in nociceptive terminals and that on activation they are able to inhibit nociceptive input.

Keywords: Analgesia, C fibers, Oxytocin receptor, Pain, WDR cells

1. Introduction

Oxytocin (OT) is a nonapeptide that is released mainly into the central nervous system by the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei.⁴⁶ Oxytocin binding sites and receptors are widely extended.¹⁸ This peptide is involved in different physiological functions such as: (1) cardiovascular activity; (2) breathing; (3) feeding; (4) social interactions; and more recently, (5) nociception.^{2,7,33,41} Regarding nociception, OT has emerged as an interesting molecule to induce analgesia at the spinal cord level, not only in animal pain models^{12,16,37,42} but also in humans.^{9,10} More recently, it was described¹⁶ as a particular cell population in the parvocellular part of the paraventricular nuclei that controls magnocellular OT activity and suppress nociception under activation. In fact, Juif and Poisbeau²⁶ demonstrated that intravenous OT administration diminishes the evoked neuronal activity associated with C-fiber activation in wide-dynamic-range (WDR) cells pointing out that this effect is at the dorsal root ganglion/DRG level. More recently, it has been suggested that OT

released from the supraoptic nuclei modulates nociception by activating oxytocin receptors (OTRs) located in DRG nociceptive neurons through a similar mechanism.¹⁶ Furthermore, experiments using whole-cell patch clamps and voltage clamps on isolated DGR neurons have found that OT inhibits the acid-sensing ion channel currents induced by acidification,⁴³ and there are similar results from studies using capsaicin.²² Certainly, OT does not cross the blood-brain barrier,¹⁷ and the current consensus about the peripheral antinociceptive properties of OT is restricted at the DRG level. Because OTRs are expressed in DRG cells^{40,55} and in the trigeminal ganglia,⁴⁹ no study has yet reported on its role in the peripheral terminal nociceptive nerve endings. However, these studies have failed to extend its potential role of peripheral action of OT on terminal nerve endings (ie, on superficial skin layer) as observed for other antinociceptive systems.³

In this context, the present study was designed to describe and test not only the potential peripheral local antinociceptive action of OT, but also the functional role of OTR in peripheral nociceptive skin terminals. To conduct this study, we used electrophysiological (extracellular unitary recordings of spinal dorsal horn WDR cells), a behavioral nociceptive test (formalin test), and molecular and pharmacological tools to reveal a new mechanism at the periphery modulating nociception. We present evidence for a specific role of OT in OTR modulating the nociceptive input at the terminal nerve endings.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

A total of 121 male Wistar rats (220–280 g) from the Neurobiology Institute Animal House were used in the experiments. Animals

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

Departamento de ^a Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología y, ^b Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

*Corresponding author. Address: Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, México. Tel./fax: +(52)(442)-238-1042. E-mail address: condes@unam.mx (M. Condés-Lara).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painjournalonline.com).

PAIN 158 (2017) 2117–2128

© 2017 International Association for the Study of Pain

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001024>

were maintained on a 12:12 hours light and dark cycle (light beginning at 07:00 hours) and housed in a special room at constant temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity (50%) with food and water ad libitum. Our Institutional Ethics Committee approved all animal procedures and protocols, and they followed the IASP ethical guidelines,⁵⁸ a Guide for the Care and Use of Laboratory Animals established by the NIH, and ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals.³⁵ All efforts were made to limit distress and use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. General methods

2.2.1. Surgical procedures for electrophysiological experiments

Animals were anesthetized with urethane (1–1.2 g/kg) and then an intratracheal cannula was inserted for artificial ventilation (55 strokes/min). Subsequently, animals were mounted onto a stereotaxic frame and secured in a spinal cord unit frame; the lumbar vertebrae were fixed to improve stability at the recording site to perform a laminectomy to expose the L2–L4 spinal cord segments. The dura was carefully removed, and to avoid desiccation, we covered the exposed spinal cord with mineral oil. The animals were not paralyzed, and we did not observe a withdrawal reaction during the experiments as previously reported.³⁶ End tidal CO_2 was monitored with a Capstar-100 CO_2 analyzer (CWI Inc, Ardmore, PA) and kept between 2.5% and 3.0% by adjusting the stroke volume to maintain a normal acid-base equilibrium. Core body temperature was maintained at 38°C using a circulating water pad.

2.2.2. Extracellular unitary recordings

Extracellular unitary recordings were made using 7 quartz-platinum/tungsten microelectrodes (impedance 4–7 $\text{M}\Omega$) mounted in a multichannel microdrive “System Eckhorn.” The multi-electrode system was manipulated with the 7-channel version of the fiber-electrode manipulator “System Eckhorn” using Eckhorn Matrix multiuser software (Thomas RECORDING GmbH, Giessen, Germany). The microelectrodes were lowered (400–900 μm from the surface) in small steps (2–5 μm) into the superficial laminae of the left dorsal horn segments to search for single-unit discharges. For each recorded cell, the specific somatic receptive field (RF) was located by tapping on the entire ipsilateral hind paw and toes; electrical stimulation was then applied by 2 electrodes inserted into the RF (see below). In this case, 2 fine needles (27 G) attached to a stimulus isolator unit were inserted subcutaneously (s.c.) into the RF of the recorded neuron. The electrical test stimulation was then conducted; this test consists of 20 stimuli at 0.5 Hz with 1-millisecond pulse duration at 1.5 times the threshold intensity (0.1–3 mA) required to evoke a C-fiber response.

The extracellular neuronal activity induced by electrical stimulation of the RF was recorded, amplified, digitalized, and discriminated using CED hardware and Spike 2 software (Version 5.20; Cambridge Electronic Design, Cambridge, United Kingdom). Raw and discriminated signals were fed through an audio monitor and displayed on an oscilloscope. Waveforms and recorded spike trains were stored on a hard drive for off-line analysis. Baselines and evoked activities of the spinal dorsal horn WDR neurons were recorded and analyzed as cumulative frequency and post-stimulus time histograms to detect the occurrence of statistically significant neuronal responses. All WDR cells recorded were found between 450 to 750 μm from the

surface. On this basis, the stimulating threshold to evoke action potentials and their frequency of occurrence, resulting from the stimulation of the peripheral RF on the hind paw, were attributed to the recruitment of A β -, A δ -, and C fibers. Considering the distance between the RF and the recording electrode, the peak latencies observed correspond to peripheral conduction velocities⁵⁰ within the A β - (0–20 milliseconds), A δ - (21–90 milliseconds), and C fibers (90–350 milliseconds) (Fig. 1A–D). Thus, the number of action potentials that occurred in response to 20 RF stimuli was compared before (basal) and after vehicle/drug (50 μL ; s.c., in the RF) treatment.

Accordingly, the neuronal-evoked responses were evaluated immediately after ($t = 0$) OT (1, 10 and 56 $\mu\text{g}/\text{paw}$; $n = 6$ cells, each dose) or vehicle (isotonic saline; $n = 5$ cells) administration at 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 minutes. The role of OTR in the OT effect was also evaluated by s.c. administration of the potent ($pK_i = 8.1$)²⁵ and selective antagonist⁵⁰ L-368,899 (10 $\mu\text{g}/\text{paw}$; $n = 4$ cells). The antagonist was administered 5 minutes before OT or vehicle.

2.2.3. Formalin-induced acute nociception

Acute nociception was assessed using the 1% formalin test.¹⁵ Rats were placed in open Plexiglass observation chambers for 1 hour during 3 consecutive days to allow them to become familiar with their surroundings. On the fourth day, and after 30 minutes in the Plexiglass chamber, they were removed for formalin administration. Formalin (1%) was injected s.c. (50 μL) into the dorsal surface of the right hind paw using a 30-gauge needle. Animals were then returned to the chambers and nocifensive behavior was observed immediately after formalin injection. Nocifensive behavior was quantified as the number of flinches of the injected paws during 1-minute periods every 5 minutes for up to 60 minutes after injection.^{34,52} Flinching was characterized as a rapid and brief withdrawal or flexing of the injected paw. Formalin-induced flinching behavior was biphasic. The initial acute phase (0–10 minutes) was followed by a relatively short quiescent period, which was then followed by a prolonged persistent response (15–60 minutes). At the end of the experiments, the rats were killed in a CO_2 chamber. Oxytocin (0.1, 10, 31, and 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$; $n = 6$ rats, each dose) or vehicle was administered 5 minutes before formalin. Furthermore, the L-368,899 was given (10 and 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$; $n = 5$ rats each dose) 5 minutes before OT or vehicle.

2.2.4. Motor coordination test

A motor coordination test (rota-rod test) in an independent group of rats was performed in a treadmill apparatus (IITC Inc Life Science, Los Angeles, CA). Briefly, this test consists of placing the animals on a cylinder (diameter: 7 cm) rotating at a constant speed of 15 revolutions per minute (rpm). Animals were trained to walk on the cylinder (cutoff time: 180 seconds) in 5 previous consecutive sessions without any treatment, and in the sixth session they received 31 $\mu\text{g}/\text{paw}$ of OT ($n = 5$) or vehicle (50 μL ; $n = 5$). The time it took to fall was counted.

2.2.5. Immunofluorescence of primary afferent fibers

The left sciatic nerve was exposed in 6 male Wistar rats (280–310 g). Distal to the 3 peripheral branches (sural, common peroneal, and tibial nerves) of the sciatic nerve, the tracer True Blue (TB) was placed under microscopic control; in this case, we used a stainless steel wire charging tiny pellets of TB attached to

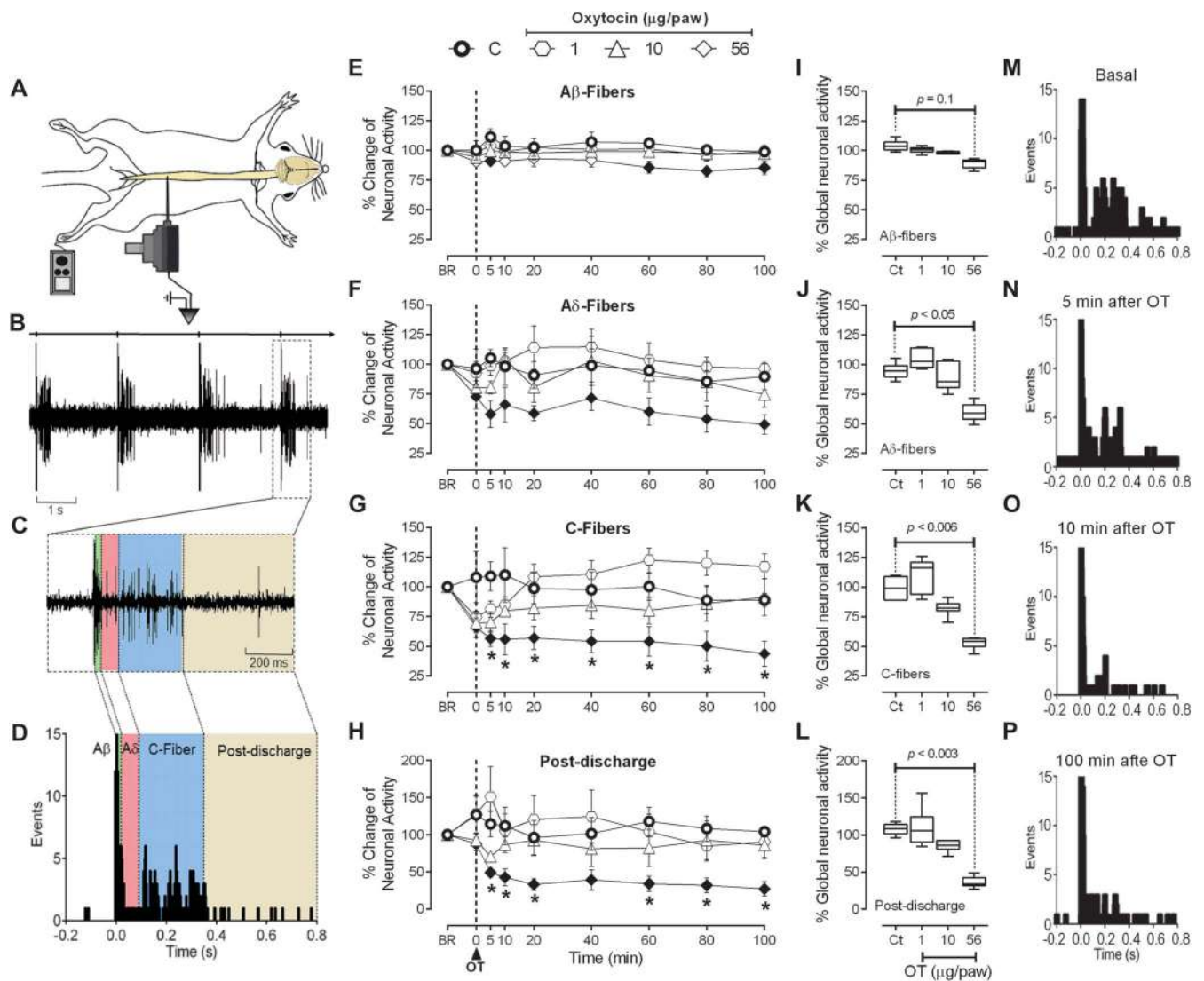


Figure 1. Peripheral oxytocin inhibits the nociceptive activation fibers arriving at second-order wide-dynamic-range (WDR) cells. (A) Experimental setup design illustrating the electrophysiological recording of lumbar spinal dorsal horn WDR cells and the location of the receptive field (RF) stimulation on the paw. (B) Raw data of 4 stimulus artifacts (upper line) and consecutive WDR responses to RF stimulation. (C) Raw tracing of a single response to RF stimulation. (D) Peri-stimulus time histograms (PSTHs) constructed from 20 WDR responses to RF stimulation depicting the different fiber components (A β fibers, A δ fibers, C fibers, and postdischarge). (E, F, G, and H) Time course changes in the percentage average of the different fibers activating WDR cell responses induced by RF stimulation and the effects to subcutaneous (s.c.) oxytocin (OT) injection (1, 10, and 56 $\mu\text{g/paw}$; $n = 6$ each dose) at time 0. * $P < 0.05$, statistically significant difference compared at the same time with control (●; $n = 5$) responses. For the sake of clarity, solid symbols (●, ▲, ◆), instead of empty symbols, represent significant ($P < 0.05$) responses vs its respective (100%) initial basal response (BR). Notice that OT predominantly inhibits (compared with control curve, ●) the response of C fibers and postdischarge. Panels I, J, K, and L show global neuronal activity (obtained from the respective time course figures) of A β fibers, A δ fibers, C fibers, and postdischarge in response to s.c. OT; this neuropeptide was able to preferentially block the neuronal activity associated to A δ fibers, C fibers, and postdischarge but not A β fibers. This inhibition is clearly depicted in panels M, N, O, and P, where the PSTHs were obtained for 1 WDR neuron illustrating the effect of s.c. OT (56 $\mu\text{g/paw}$) at different times after OT administration. In this case, note that OT blocks the activity associated with the activation of nociceptive fibers (ie, A δ fibers and C fibers).

its blunt tip. After 5 days, the animals were killed by decapitation and immediately after, the lateral hairy skin areas were excised with a scalpel, snap frozen in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc, Torrance, California), placed in liquid nitrogen-chilled isopentane, and stored at -80°C before sectioning.

Triple immunofluorescence for the OTR, IB4, and calcitonin gene-related peptide (CGRP) was performed on free-floating and slide-mounted samples of 50- μm thick cryostat sections after fixation in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. A primary antibody cocktail was used for 24 hours at 4°C ; it included polyclonal antibodies against OTR (raised in goat, diluted 1:400, Cat.no. sc-8103; Santa Cruz

Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) and the CGRP (raised in rabbit, diluted 1:2000, Cat.no. AB15360; Chemicon International, Temecula, CA). The sections were washed for 5 minutes with 0.1 M PBS and then incubated with the appropriate secondary antibody for 24 hours at 4°C . The secondary antibodies used were donkey anti-Goat IgG (Alexa Fluor 488 conjugate, Cat.no. A-11055; Invitrogen, Grand Island, NY) and donkey anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 647 conjugate, Cat.no. A-31573; Invitrogen). To detect isolectin B4 (IB4) binding, we included 1:400 *Griffonia simplicifolia* isolectin (GS-IB4) Alexa Fluor 568 (Cat.no. I21412; Invitrogen) during secondary antibody incubations.

An extra group of 3 rats was required during the submission process. This group had the same experimental protocol but

the tissue was cut serially in 20 μm -thick cryostat sections. One section was treated as previous experiments and the following sections without the primary antibody for each OTR (1:400), IB4 (1:400), or CGRP (1:2000). This maneuver allowed us to reveal the possible unspecific immunofluorescence for the OTR, IB4, and CGRP in order to avoid a possible false positive staining.

2.2.6. Confocal microscopy and image analysis

Confocal images of the peripheral terminal sensory in the lateral hairy skin were acquired using the LSM510 or LSM780 confocal microscope system (Zeiss, Mexico) with $25\times/0.8$, $40\times/1.3$, and $63\times/1.32$ NA oil immersion objective. Using the 488-nm argon laser to excite Alexa Fluor 488, 561-nm diode laser for Alexa Fluor 568, and 633-nm helium/neon laser to excite the Alexa Fluor 633 signal. The pinhole, Z-sectioning intervals were kept constant for all images. About 40 to 100 optical Z-sections of 1- μm thickness were obtained from the 50- μm thick tissue for each skin image stack.

Optical sections were acquired at a digital size of 1024×1024 pixels and averaged 3 times to reduce noise. In all cases, the image obtained was improved (brightness and gamma) and analyzed using the ZEN 2 Blue Edition Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany). In addition, the color for each channel was selected as follows: green for OTR, red for IB4, and blue for CGRP. In all cases, a 2-dimensional projection image and a single-optical section image (where the OTR signal was strong) were imported in Tag Image File Format (TIFF) and were used to compose the multipanel figures. Furthermore, projection images were 3D rendered and a pseudo-3D (2.5D) graphic was made. In addition, an orthogonal projection using 6 to 8 optical sections was performed.

2.2.7. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot

A group of 12 rats was subdivided into 3 groups (control; saline injection, 50 μL /paw, s.c.; and 1% formalin injection, 50 μL /paw, s.c.; $n = 4$ each) to determine the presence of OTR in the peripheral nerve. After 1 day postinjection, all animals were killed by decapitation and the left sciatic nerve (ipsilateral to s.c. injection) was exposed; the connective tissue was carefully removed and the nerve was cut above the trifurcation of the tibial, common peroneal, and sural rami nerves. Then, the fragments were frozen and stored at -70°C . In all cases, an ≈ 2 -cm fragment of sciatic nerve was collected.

The tissue was homogenized and extracted for 2 hours by agitation in ice-cold hypotonic Tris-HCl buffer (Tris 50 mM, pH: 9) containing a protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Roche, Mannheim, Germany) and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma, St. Louis, MO). The homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes at 4°C . The supernatants were collected and the protein content was quantified using the Bradford method.⁵ Then 30- μg protein of each sample was resolved by 1-dimensional denaturing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis in 1.0-mm thick, 6-cm long, 12% gel using the Laemmli³¹ buffer system in a Mini-PROTEAN II cell (Bio-Rad, Hercules, CA). The samples were run under reducing conditions (in the presence of 5% [wt/vol] 2-mercaptoethanol) and constant voltage (100 V stacking gel; 150 V separating gel). Prestained molecular weight markers (Bio-Rad) were used to estimate the molecular weight.

After electrophoresis, the slabs were equilibrated in cold transfer buffer (25 Mm Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% methanol vol/vol, pH 8.3) for 30 minutes and electrotransferred (at 200 mA for 1 hour)⁴⁷ to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After transfer, the membranes were washed with 30 mM Tris, 500 mM NaCl Tris Buffered Saline (TBS), at pH 7.5 for 10 minutes, then blocked with 5% (wt/vol) nonfat dry milk (Bio-Rad) in TBS for 2 hours. After washing the membranes 3 times with Tris Buffered saline with tween 20 TTBS (TBS containing 1% [wt/vol] non-fat dry milk, and 0.05% [wt/vol] Tween 20) for 10 minutes, they were incubated overnight at room temperature in TTBS with the OTR antibody (raised in goat, diluted 1:500, Cat.no. sc-8103, Santa Cruz Biotechnology Inc). After that, membranes were rinsed 3 times (10 minutes each) in TTBS and incubated during 2 hours at 4°C with a secondary antibody (rabbit anti-Goat IgG-HRP conjugate, diluted 1:3000, Cat.no. 81-1620; Invitrogen). Protein signal detection was achieved by incubating the membranes in Electrochemiluminescence (ECL) reagent (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, United Kingdom) for 5 minutes and exposed to Kodak BioMax ML film. The next day, blots were stripped and incubated overnight at room temperature with GAPDH antibody (raised in rabbit, diluted 1:1000, Cat.no. 2118; Cell Signaling Technology); membranes were then rinsed 3 times with TTBS and incubated for 2 hours at 4°C with a secondary antibody (goat anti-Rabbit IgG-HRP conjugate, diluted 1:3000, Cat.no. 65-6120; Invitrogen). The anti-GAPDH was used as internal control to normalize OTR's protein expression level. In both cases, immunoblots were scanned and bands were semiquantitatively analyzed using Image Lab Software (v5.2.1; Bio-Rad Laboratories).

2.2.8. Drugs

In addition to the anesthetic (urethane), this study used the following compounds (obtained from the sources indicated): OT acetate salt hydrate (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) and the (S)-2-amino-N-((1S,2S,4R)-7,7-dimethyl-1-((4-*o*-tolylpiperazin-1-ylsulfonyl) methyl) bicycle [2.2.1] heptan-2-yl)-4-(methylsulfonyl) butanamide hydrochloride (L-368,899 hydrochloride; Tocris Bioscience, Northpoint, United Kingdom). The OT was dissolved in physiological saline, whereas L-368,899 was dissolved in 10% DMSO, and the resulting solution was gauged with saline. These vehicles had no effect on the baseline values of neuronal activity or on behavioral responses. The doses mentioned in this text refer to substance-free base.

2.2.9. Statistical analysis

All data, tables, and figures in the text are presented as mean \pm SEM. The number of evoked potentials induced by electrical stimulation of the paw was normalized and expressed as percentage change from the respective baseline (100%). This baseline response was established after an identified neuron had a $\leq 10\%$ variation in the neuronal responses induced by RF stimulation during 5 consecutive tests (10 minutes between each test). Furthermore, the baseline value refers to evoked neuronal response before peripheral treatment with OT or L-368,899 plus OT. The difference in neuronal activity evoked within 1 group of animals before and after treatment was compared using a 2-way repeated measures analysis of variance. In addition, temporal-course was adjusted to obtain global neuronal activity because of the treatment; in this case, a 1-way analysis of variance was performed. In the formalin test, curves were constructed by plotting the number of flinches as a function of time. The area under the number of flinches against

time curves, an expression of the duration and intensity of the effect, was calculated by the trapezoidal rule, and a 1-way analysis of variance was performed. In the motor coordination test, a Student *t* test was used to compare time to fall. The 1-way and 2-way analyses of variance were followed, if applicable, by the Student–Newman–Keuls post hoc test. In all cases, statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Peripheral local administration of oxytocin inhibits the nociceptive activity of the second-order wide-dynamic-range neurons

Peripheral electrical stimulation of the RF elicited well-defined neuronal responses of the spinal dorsal horn WDR cells (Fig. 1A–D). Briefly, 1 pulse of stimuli in the RF elicited a classical neuronal response of a spinal second-order WDR neuron (Fig. 1B–C). This neuronal activity could be broken down according to the conduction velocities of primary afferent fibers (ie, A β -, A δ -, C fibers, and postdischarge) (Fig. 1D). Interestingly, after a single subcutaneous administration of OT (s.c.; 1–56 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) (Fig. 1E–H), a dose-dependent decrease in the firing responses elicited by 20 electrical stimuli on the RF was observed (compared with its respective basal responses). These inhibitions ($\approx 40\%$ – 60% of basal response) were particularly more pronounced in the A δ fibers, C fibers, and postdischarge, starting 5 minutes after OT administration and lasting up to 100 minutes. When we analyzed these results as global neuronal activity (Fig. 1I–L), we found that OT mainly inhibits the neuronal firing associated with the activation of A δ fibers, C fibers, and postdischarge

(Fig. 1J–L). Figure 1M–P show peri-stimulus time histograms obtained from 1 WDR neuron before and after OT administration; these figures clearly depict the inhibition of C-fiber activity.

3.2. The antinociceptive effect of subcutaneous oxytocin has a local and specific effect

Because the electrophysiological experiments showed that OT selectively inhibits the activity of A δ and C fibers, a set of experiments using the 1% formalin test (50 μL formalin injected s.c. into the dorsal surface of the hind paw) were performed to test the potential antinociceptive behavioral effects of peripheral local OT. Subcutaneous (s.c.) formalin produced a typical pattern of flinching behavior characterized by a biphasic time course (Fig. 2A). Phase I of the nociceptive response began immediately after formalin injection and then gradually declined (≈ 10 minutes). Phase II began about 15 minutes after formalin injection and lasted for 1 hour. Subcutaneous injection of OT (31 and 100 μg ; ipsilateral to formalin injection) significantly prevented formalin-induced nociception in rats (Fig. 2A). Indeed, OT but not vehicle, prevented flinching behavior in phase I (100 $\mu\text{g}/\text{paw}$; Fig. 2B) and phase II (31 and 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$; Fig. 2C) of the formalin test. In contrast, contralateral peripheral injection of a supramaximal dose of OT (100 $\mu\text{g}/\text{paw}$) failed to modify formalin-induced flinching behavior, thus indicating a local effect. This antinociceptive action is not only local but also specific, because the highest dose of OT did not produce any changes in the motor coordination test (Fig. 2D). We also used Western blotting and found that OTR is expressed in the sciatic nerve, which innervates the paw; moreover, the s.c.

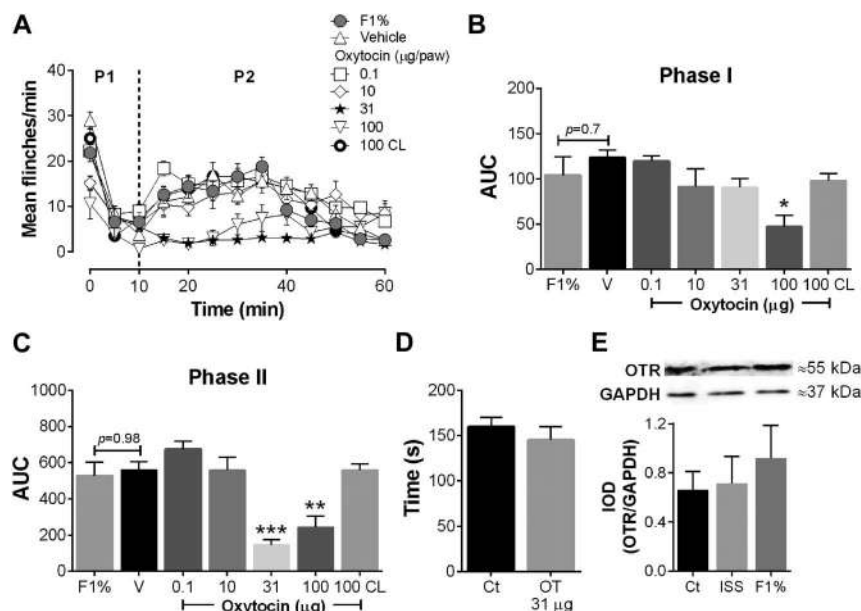


Figure 2. Subdermic oxytocin (OT) administration selectively inhibits behavioral nociception. (A) Time course during phase I (P1) and phase II (P2) of the mean number per minute of flinches observed after subcutaneous (s.c.) treatment with vehicle (V) ($n = 6$) or OT (0.1–100 $\mu\text{g}/\text{paw}$; $n = 6$ each dose) in rats submitted to the 1% formalin test. Note that although 31 and 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$ (administered ipsilaterally to formalin injection) diminish nociceptive behavior, 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$ (administered contralaterally [100 CL]; $n = 6$) follows the same pattern as the formalin curve (F1%; $n = 6$) and the control curve (vehicle). Panels B and C show the time course data expressed as area under the mean number of flinches against time curve (AUC). Oxytocin reduced AUC values during phase I (100 $\mu\text{g}/\text{paw}$) and phase II (31 and 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$), indicating an antinociceptive effect; remarkably, 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$ of OT administered contralaterally has no effect on the flinching behavior induced by formalin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, statistically significant difference compared to V. (D) Oxytocin ($n = 5$) has no effect (compared to control; $n = 5$) on the time spent (seconds) on the treadmill apparatus (rota-rod test) before falling, suggesting that OT-induced antinociception is specific. (E) Western blot analysis of the oxytocin receptor obtained from the sciatic nerve of naive rats (Ct; $n = 4$), or isotonic saline solution (ISS; $n = 4$) or formalin (F1%; $n = 4$) injected (50 $\mu\text{L}/\text{paw}$). The sciatic nerve tissue was collected 1 day after ISS or formalin injection. Data are expressed as the integrated optical intensity. This Figure 2 in A the abscissa has not level and it is TIME. normalized against GAPDH, and they represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

formalin injection (Fig. 2E) did not seem to modify this expression.

3.3. Blocking the oxytocin receptors abolished the oxytocin-induced antinociception in behavioral and electrophysiological assays

Because OTRs seem to be expressed in the sciatic nerve (Fig. 2E), we examined their functional role in the electrophysiological and behavioral experiments. As shown in Figure 3, a subcutaneous injection of the potent and selective OTR antagonist L-368,899 (10 and 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$) was able to block the 31 $\mu\text{g}/\text{paw}$ OT-induced behavioral antinociception (Fig. 3A–C). This effect was clearly observed in phase II of the formalin test (Fig. 3C) and no changes were observed in animals pretreated with the vehicle. Interestingly, an increase in the nocifensive response was elicited in the 10 $\mu\text{g}/\text{paw}$ L-368,899 during phase II (Fig. 3C). Furthermore, when we measured the neuronal activity of a group of WDR neurons (Figs. 3D–H, 4), we found that OT-induced A δ fiber C fiber, and postdischarge inhibition were abolished by the 10 $\mu\text{g}/\text{paw}$ L-368,899, and we observed no effect when we only administered the antagonist (Fig. 4B–D).

3.4. Oxytocin receptors are present in CGRPergic fibers but not in IB4 terminal sensory fibers

Figure 5 shows the immunofluorescence to OTR, IB4, and CGRP from 3 different experiments (A, B, and C); it is important to point out that in the absence of primary antibodies, no unspecific staining was observed (Fig. 5Aiii–Ciii). Furthermore, as shown in Figure 6, OTRs (Ai) do not colocalize with IB4 (Aii) but predominantly colocalizes with CGRPergic fibers (Aiii). In both cases (CGRP+ and IB4+ fibers), the sensory fibers were located between the epidermis and dermis, suggesting that OTR could be expressed in the terminal nerve fibers. It is interesting to note that although the projection image (z-stack projection) (Fig. 6Ai–iv) clearly depicts the presence of OTR, IB4, and CGRP in the tissue, OTRs were mainly colocalized with CGRP as it was observed in 1 representative orthogonal view section (see Fig. 6B). These results are clearly depicted in several representative single optical sections (Fig. 6Ci–iv). Similar results are shown in Figure 7 (see also supplemental Figure 4, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A459>), where OTRs (i) did not colocalize with IB4 fibers (ii) but it had a colocalization with CGRPergic fibers (iii).

Finally, although we did not find TB-positive fibers in the periphery, the tracer was successfully carried at the spinal cord (data not shown).

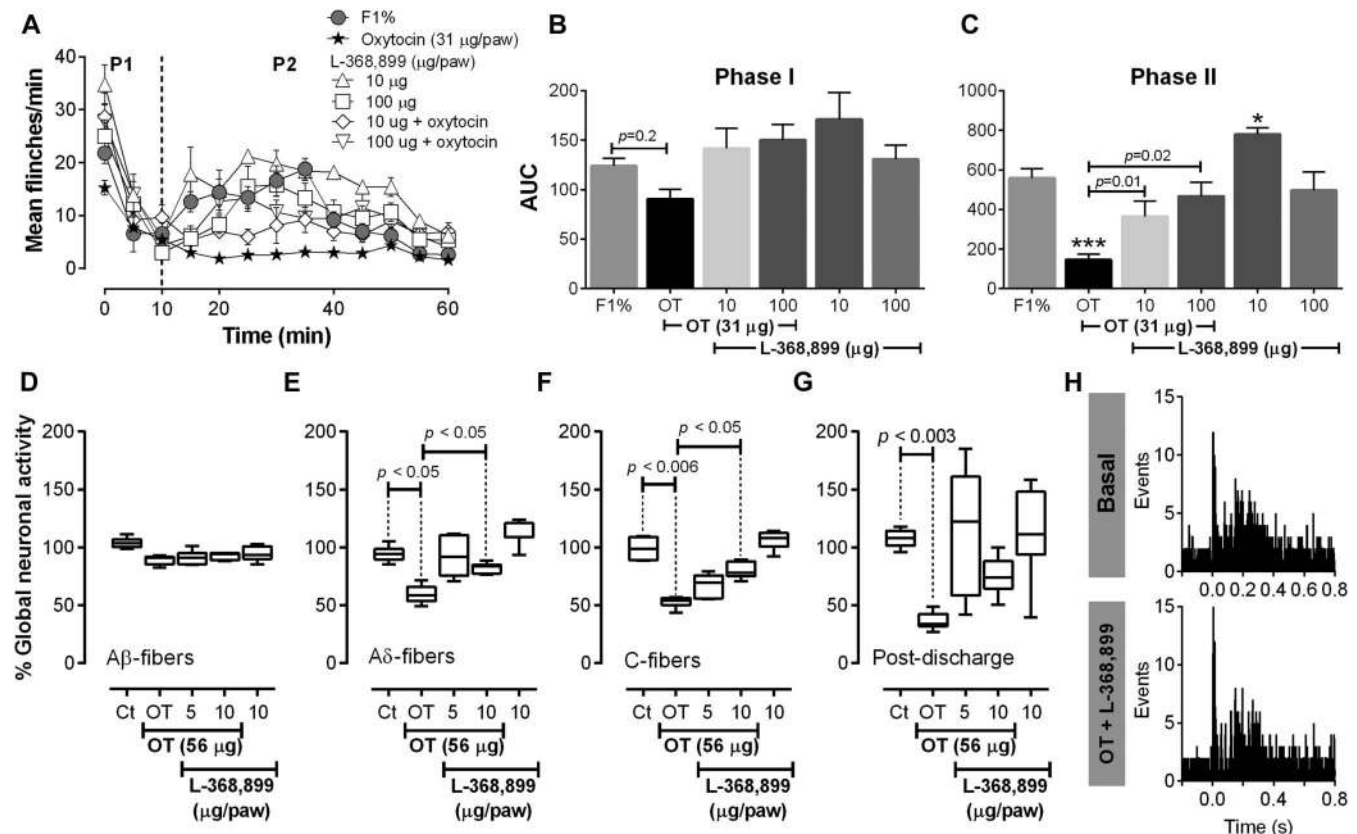


Figure 3. Role of oxytocin receptors (OTRs) in behavioral and electrophysiological oxytocin (OT)-induced antinociception. (A) Time course during phase I (P1) and phase II (P2) of the mean number of flinches observed after subcutaneous treatment with L-368,899 (10 or 100 $\mu\text{g}/\text{paw}$; OTR selective antagonist; $n = 5$ each dose) or L-368,899 plus OT (31 $\mu\text{g}/\text{paw}$; $n = 5$) in rats submitted to the 1% formalin test. Note that L-368,899 reverses the OT-induced antinociception. Panels B and C show the data from the time course expressed as area under the mean number of flinches against time curve. Blockade of OTR by L-368,899 inhibits the OT-induced antinociception in phase II; it is interesting to note that 10 $\mu\text{g}/\text{paw}$ L-368,899 enhances the flinching (C) behavior induced by formalin. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, statistically significant difference compared to formalin (F1%). (D, E, F, and G) Global neuronal activity (obtained from the respective time course figures, see supplemental digital content, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A459>) of the wide dynamic-range (WDR) cells in response to 56 $\mu\text{g}/\text{paw}$ OT ($n = 6$) or 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{paw}$ L-368,899 plus OT ($n = 4$ each dose). Pretreatment with L-368,899 was able to block the OT-induced inhibition of neuronal activity associated with A δ -fiber and C-fiber activation. Note that 10 $\mu\text{g}/\text{paw}$ L-368,899 alone ($n = 4$) has no significant effect on the neuronal-evoked responses. Panel H shows 2 PSTH obtained before (basal response) and after OT + L-368,899 (1 hours after oxytocin) for 1 WDR neuron, thus illustrating that L-368,899 (56 $\mu\text{g}/\text{paw}$) inhibits the OT-induced antinociception (compared with Fig. 1N–P).

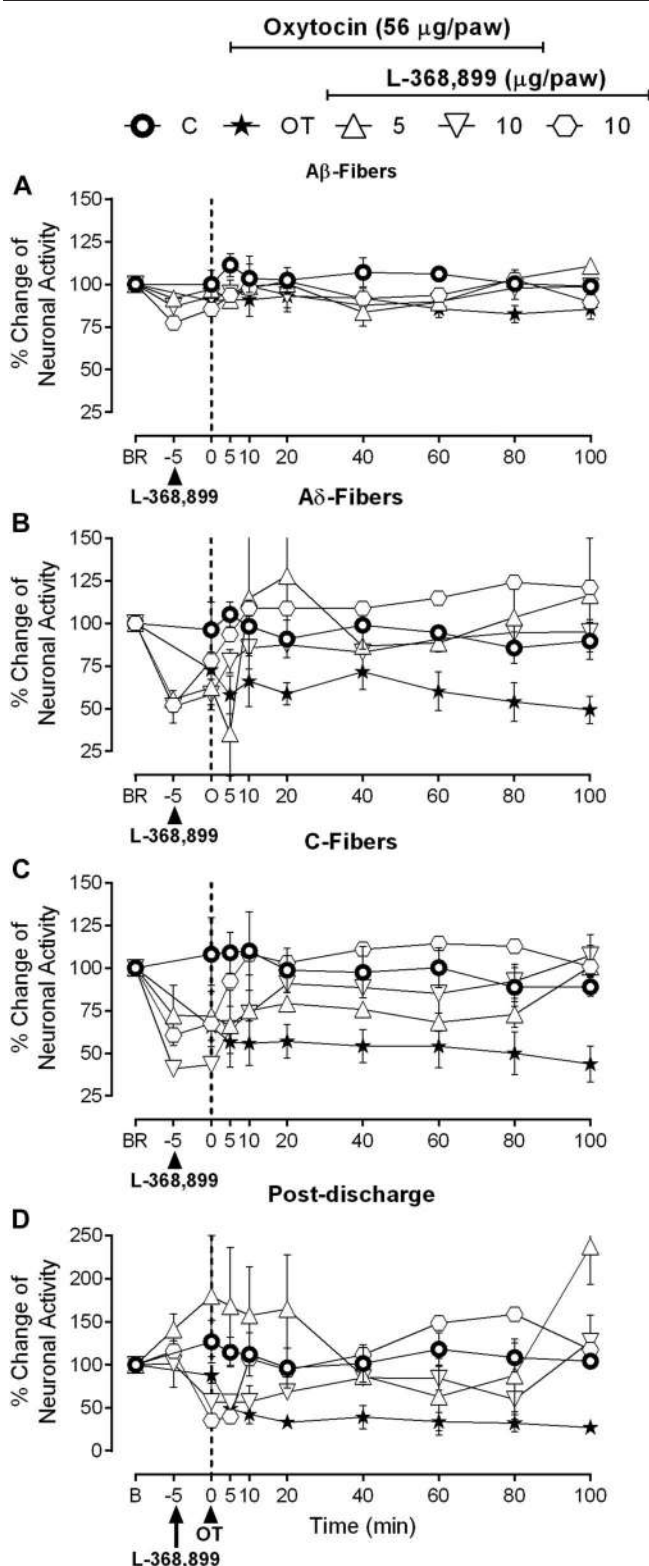


Figure 4. Blockade of oxytocin receptors (OTRs) inhibits the oxytocin (OT)-induced antinociception in the second-order wide-dynamic-range (WDR) cells mediated by (A) Aβ-, (B) Aδ-, (C) C fibers, and (D) postdischarge. Effect of subcutaneous bolus injection of L-368,899 per se or on the inhibition of nociceptive WDR responses induced by OT (56 μg/paw) of the receptive field electrical stimulation. **P* < 0.05 vs the corresponding control response (●). BR, basal response, before any administration.

4. Discussion

4.1. General

Our findings show that peripheral activation of OTRs on the superficial skin layer is able to induce inhibition of the C-fiber discharge and suppress behavioral nociception. Oxytocin receptors could be expressed in CGRPergic terminal nerves innervating the superficial skin. The role of this receptor is supported considering that subcutaneous OT-induced antinociception was reverted by L-368,899 (a potent and selective OTR antagonist) in electrophysiological and behavioral experiments. This effect seems to be local, because OT ipsilateral (not contralateral) to formalin inhibited nociception in the formalin test.

4.2. Subcutaneous oxytocin blocks the nociceptive input to the spinal dorsal horn wide-dynamic-range cells

As previously reported,⁵⁰ electrical stimulation of the peripheral RF produces a typical well-defined triphasic neuronal-evoked response corresponding to Aβ-, Aδ-, and C-fiber activation. We found that OT administered s.c into the RF inhibits the evoked nociceptive (Aδ fiber and C fiber) neuronal responses (Fig. 1) and this effect lasts up to 100 minutes. Although at this point we cannot ascertain the specific location of OT effects (ie, peripheral vs central), some studies suggest that OT not only induces analgesia in the spinal cord of rodents^{8,37,57} and humans,^{9,10} but also inhibits nociception at the peripheral level by acting on OTRs located in the DRG,^{16,26,30} as described in the Introduction section.

Indirect evidence for this hypothesis came from an early study in a mouse model of chronic abdominal pain where an in vivo intracolonic administration of a selenoether OT analog with similar biological activity in OTR than OT was able to inhibit chronic visceral hypersensitivity.¹¹ This suggestion gains weight when considering the pharmacokinetic properties of several neuropeptides, including OT (such as poor absorption and low metabolic stability).²⁹ Therefore, it is reasonable to suppose that the pharmacological effect observed after single s.c. OT administration is restricted to a local effect. To validate this hypothesis, we performed behavioral, molecular, and pharmacological tests.

4.3. Oxytocin inhibits the formalin-induced flinching behavior by a local and specific effect

Because s.c. OT inhibits the nociceptive-evoked activity of WDR cells, we hypothesized that this inhibition should be replicated in a pain behavior model. In accordance, flinching behavior induced by s.c. formalin is dose-dependent reduced by OT in both phases (Fig. 2A–C). Considering that 100 μg/paw OT in the contralateral paw was ineffective, this neuropeptide seems to be a local effect. Moreover, although 100 μg/paw OT inhibited the nociceptive behavior in both phases, it has been reported that 200 to 1000 μg/kg OT (50–250 μg for a 0.25 kg rat) administered s.c. inhibited the locomotor activity (ambulatory and nonambulatory) by activating peripheral V1a receptors.⁵⁴ To avoid possible bias because locomotor performance could influence the nociceptive tests,²⁷ we decided to use the dose of 31 μg/paw OT. In any case, the 31 μg/paw (that inhibited phase II of the formalin test) did not have any effect on the motor coordination test when using the rota-rod test (Fig. 2D). The notion that s.c. OT uses a local mechanism to exert its antinociceptive effect is strongly supported in conjunction with the fact that OTRs are expressed in the sciatic nerve (Fig. 2E).

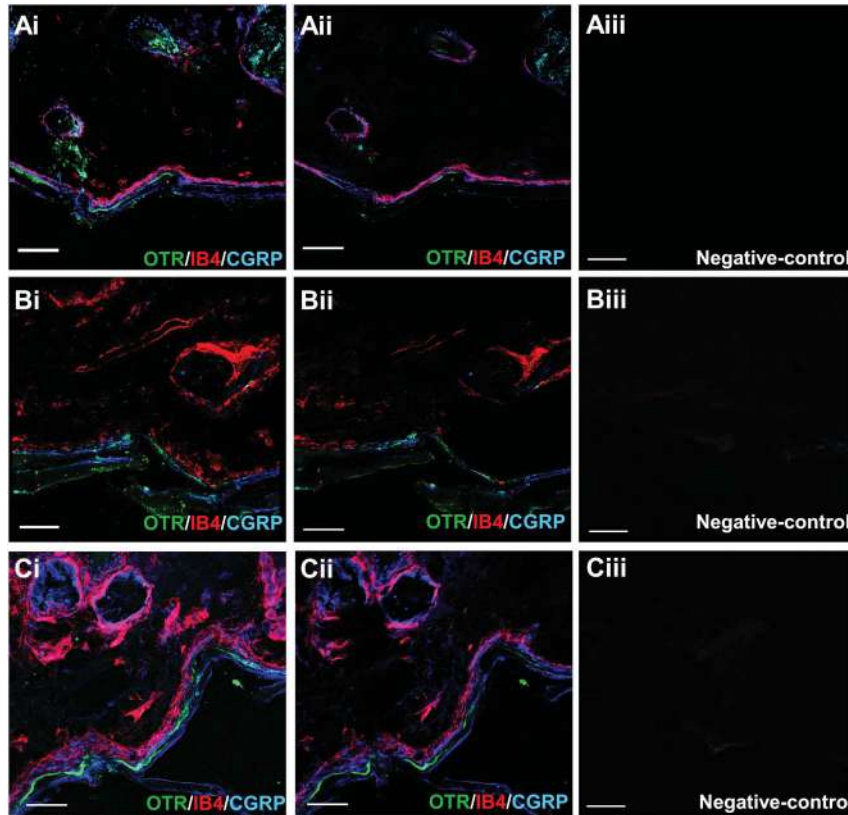


Figure 5. Confocal image of a skin section for oxytocin receptor (OTR), IB4, and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunofluorescence. Panels Ai, Bi, and Ci are the z-stack projection from 40 optical sections ($25\times/0.8$ NA objectives) from 3 different experiments. Panels Aii, Bii, and Cii are single optical sections from the z-stack projection; the optical section was selected at the point that signal for OTR was better (see supplemental Figures 1, 2, and 3 for details about the OTR colocalization with CGRP and IB4; available online at <http://links.lww.com/PAIN/A459>). The co-localization between OTR and CGRP is shown in white-grey colors. Panels Aiii, Biii, and Ciii are the negative controls showing no specific labeling in the absence of primary antibodies. It is important to point out that in this set of experiments the intensity color was adjusted at the maximum to appreciate possible unspecificity from the secondary antibodies used. Scale bars: $50\ \mu\text{m}$.

4.4. Defining the role of peripheral oxytocin receptors in peripheral oxytocin-induced antinociception

Direct evidence of the involvement of peripheral OTRs in OT-induced antinociception in behavioral (Fig. 3A–C) and electrophysiological (Fig. 3D–H) experiments originates from the fact that antinociception was clearly antagonized by L-368,899, a specific and potent OTR antagonist⁵³ (Fig. 4). Correspondingly, we found that OTRs could be localized in cutaneous nociceptive peptidergic terminals (Figs. 5–7). Previous reports have strongly supported the role of peripheral OTRs in nociception,^{16,26} but the potential role in peripheral nociceptor endings remains obscure, as previously suggested.¹⁹ In this context, a previous study using an isolated ex vivo preparation showed that OT could block the capsaicin-induced release of CGRP from dural nociceptors,⁴⁹ supporting the idea that OTRs could be present in terminal nerve endings. Certainly, apart from the spinal cord^{40,48,55} DRG⁴⁰ and trigeminal ganglia,⁴⁹ OTR was found in mouse embryonic skin²¹ supporting our hypothesis. In this context, our work is the first to show that OTRs can be found in nociceptive terminals and that on nociceptive stimulation they are able to inhibit the nociceptive input.

4.5. Considerations about the specificity of the antibody against oxytocin receptor

During the submission process of the present paper, the reviewers strongly suggested to perform an immunostaining control to avoid the possible false positive OTR in skin terminals. In Figure 5, the

first antibody missing showed nonunspecific staining. In addition, during the submission, a new possibility of OT action was published in PAIN in which Kubo et al.³⁰ suggested that the OT effects suppressing orofacial hypersensitivity can be mediated by the vasopressin (VP)-1A receptor (V_1A-R). This assumption is based on the action of a selective V_1A-R antagonist over isolated trigeminal ganglia neurons. Considering the molecular structure similarity between OT and VP, this assumption is a possibility as was also suggested elsewhere⁴⁴ using OT knockout mice. However, the isolated trigeminal ganglia neurons³⁰ as well as the knockout OT mice⁴⁴ used could develop compensatory mechanisms to compensate the lack of OT regulations. Nevertheless, the question that remains is whether OT could have a cross-action with the V_1A-R , although this question does not invalidate that our current description of peripheral OTR used OT to act. Considering the molecular, electrophysiological, pharmacological, and behavioral results and that the current OTR has a juxtaposition with peptidergic CGRP fibers, an important possibility is that OT uses the OT receptor.

A serious characteristic for using antibodies in research is their specificity, a property dependent on the species studied. In a recent study, using OTR knockout mice⁵⁶ has suggested that the antibody used in our study has a lack of specificity to detect adequately the presence of OTR. However, the large number of regulatory elements controlling transcription and tissue-specific localization of the OTR¹⁷ and the fact that knockout mice could develop an array of compensatory

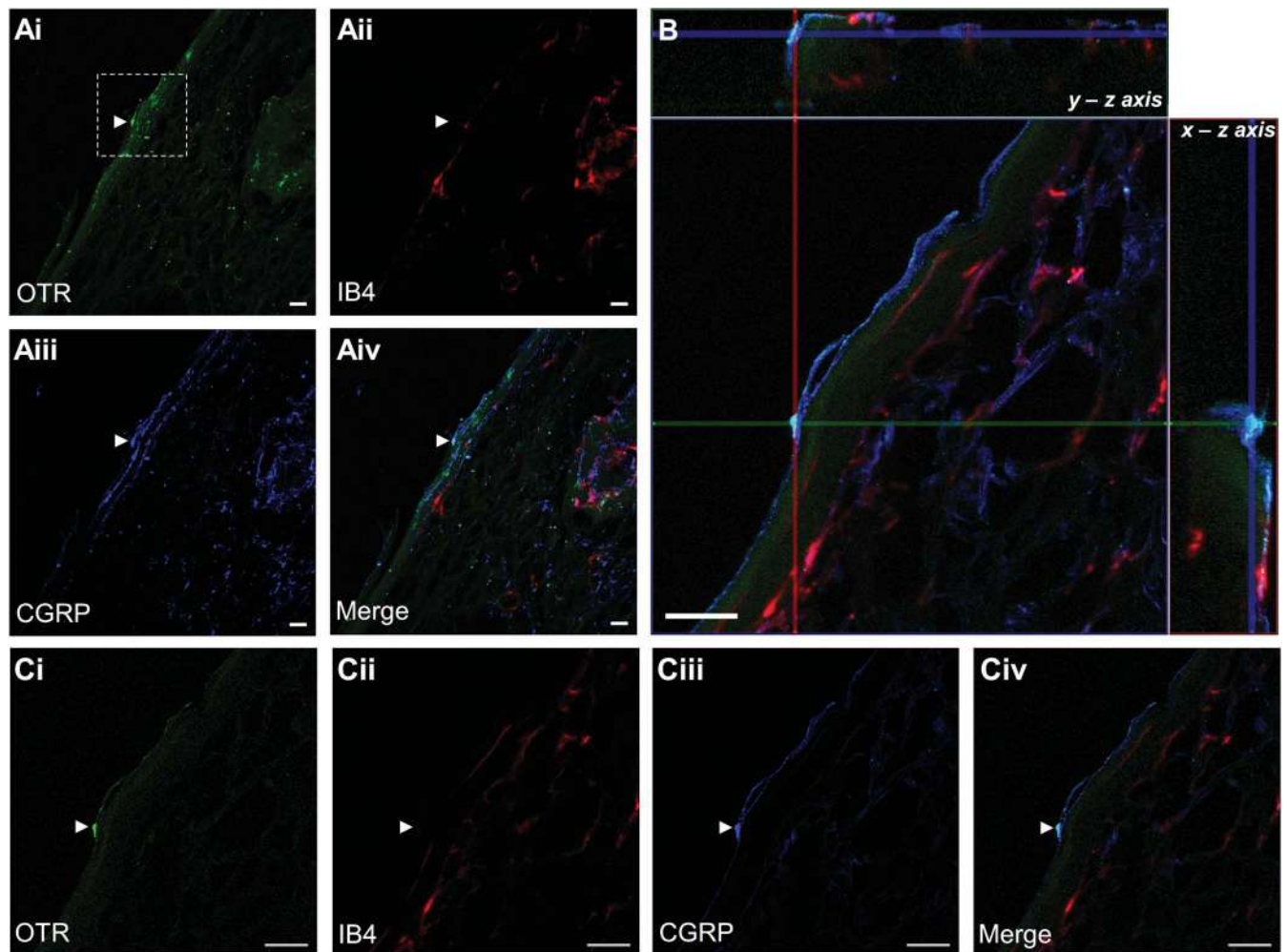


Figure 6. Triple labeling of terminal nerve endings in dermis and epidermis sections with antibodies against oxytocin receptor (OTR), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and IB4. Confocal microscopic images of OTR (green), IB4 (red), and CGRP (blue) immunofluorescence in the skin. Ai, ii, iii, and iv are z-stack projection from 8 optical sections; images were taken with 25 \times /0.8 NA objectives. The arrows show the free termination of OTR positive. Panel B shows an orthogonal view displaying 8 optical sections (1 μ m each) at 40 \times /1.3 NA; y-z plane and x-z axis show colocalization between OTR (green) and CGRP (blue) but not with IB4 (red). The co-localization between OTR and CGRP is shown in white colors. Ci-Civ show a focal plane of the z-stack; OTR and CGRP appear in the same plane and the arrow shows the free termination OTR and CGRP positive; this image was taken with 25 \times /0.8 NA objectives. Scale bars: 50 μ m.

mechanisms to adjust the absence of deleted receptors (ie change the endogenous protein expression profile²³), this transgenic approach could lead to a potential flaw in the immunodetection of this receptor. Admittedly, the evidence presented by Yoshida et al.⁵⁶ could undermine our findings using immunofluorescence, but we need to keep in mind that perhaps the knockout OTR model is not the best model to evaluate the antibody specificity for a key receptor involved in several significant physiological functions.¹⁸ Thus, the physical presence of OTR at the periphery will be definitely established with the advent of more selective OTR antibodies, which to the best of our knowledge, are not currently available. In any case, our pharmacological experiments, (in electrophysiological and behavioral tests) using a highly potent and selective OTR antagonist, support the presence of this receptor at the peripheral level. Consequently, it is important to point out some key aspects to properly appreciate the results found: First, in our manuscript we discuss and present evidence of others research groups suggesting that OTR could be expressed in the peripheral nerves.^{11,13,14,16,21,26,49}

Second, the antibody used is recommended for the detection of OTR by Western blotting, immunofluorescence, and

enzyme-linked immunospecific assay. Apart from the use of mice, the work done by Yoshida et al.⁵⁶ was performed using immunohistochemistry. Although immunohistochemistry and immunofluorescence are similar techniques, a key information in the work of Yoshida et al.⁵⁶ is missing (the dilution used). Indeed, the antibody concentration used is critical to avoid false positive results when considering that VP AV1a receptors are similar to OTR and share a high degree of homology.^{28,29} Furthermore, the “un-specific” antibody (LS-A246) tested by Yoshida et al.⁵⁶ (antibody to OTR) was primarily designed to react preferentially with the human OTR instead of the rodent OTR. Indeed, the LS-A246 was raised against synthetic 16 amino acids from the third cytoplasmic domain of the human OTR. This is relevant considering that although a high degree of homology between rat and human OTR exists, the third intracellular loop are different between these 2 species,^{1,28,39} and maybe the fact that the signal by LS-A246 was observed in knockout mice⁵⁶ reflects the complexity of compensatory mechanisms in these animals.

Subsequently, the specificity and sensitivity of the antibody that we used has been tested by several research groups analyzing not only the role of OTR in nociception³⁸ but also in autonomic and cardiovascular systems.^{6,20,24,32,45,51} Hence, the interesting

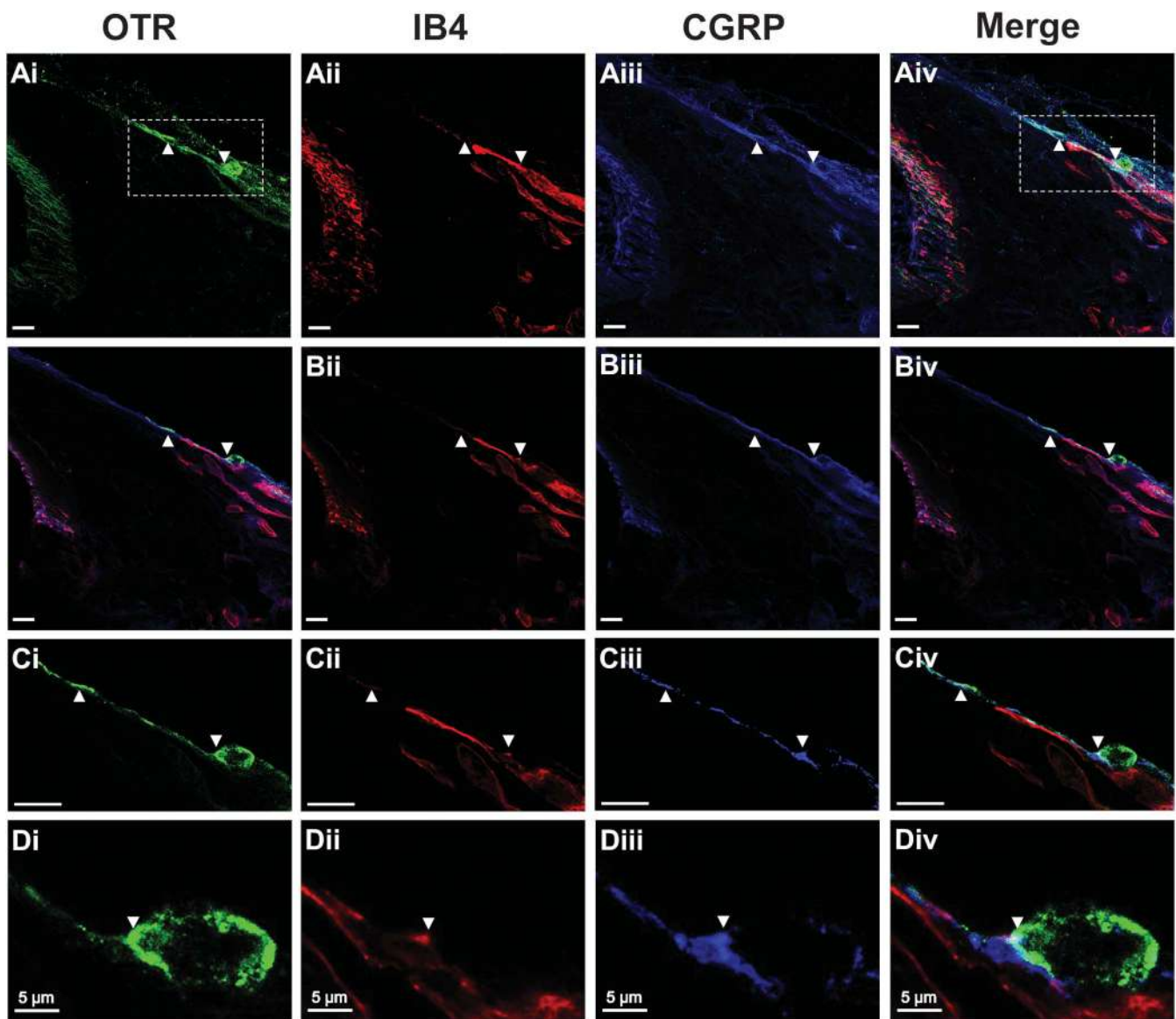


Figure 7. Triple-labeling of terminal nerve endings on dermis and epidermis sections with antibodies against oxytocin receptor (OTR), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and IB4. Representative confocal images of immunofluorescent-labeled terminal sensory nerves in the lateral hairy skin paw (OTR in green, IB4 in red, and CGRP in blue). Panels in A are the z-stack projection from 40 optical sections; the images were taken with $25\times/0.8$ NA objectives. The arrows show the OTR-positive fiber and cellular body. Panels in B are single optical sections taken with $40\times$ objective (section thickness $1\ \mu\text{m}$) from the z-stack projection in A. Panels in C are single optical sections ($40\times/1.3$ NA) from the box in panel A. Panels in D are cropped images from panel C showing a terminal nerve ending. Although the z-stack projection (Ai, ii, iii, and iv) depicts the presence of OTR, IB4, and CGRP in the tissue, OTRs are predominantly colocalized with CGRP when we observe the 1 representative optical section (see B, C and D). The co-localization between OTR and CGRP is shown in white colors (see merge). These results are clearly depicted in several representative optical sections (orthogonal view, supplemental Figure 4, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A459>), and this suggestion is reinforced by similar data obtained from the 3D-rendered and 2.5D-reconstructed images (see supplemental Figures 5 and 6, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A460> and <http://links.lww.com/PAIN/A461> respectively). Scale bar in panels A, B, and C: $20\ \mu\text{m}$.

findings by Yoshida et al.⁵⁶ suggesting that this antibody is unspecific need to be taken cautiously.

Finally, regarding the physiological function of OTRs on peripheral skin, OT is expressed in cultured human keratinocytes and is released in response to external stimuli (resembling injuries).¹⁴ Skin keratinocytes responding to stimulation can indirectly modulate the activity of sensory fibers¹³ and could modulate action potentials in primary afferent fibers.⁴

5. Conclusion

Our work suggests that the antinociception induced by subcutaneous OT is mediated by a peripheral mechanism (probably

at the terminal nociceptive fiber endings by OTR activation), and it reveals a new potential role for OT in pain modulation.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors thank Jessica González Norris for reviewing the grammatical aspects of this paper. In addition, the authors also acknowledge Elsa Nydia Hernández Ríos for her technical assistance in confocal microscopy. This work was sponsored by

grant (to MCL) PAPIIT-UNAM (Grant No. IN200415). IATG is a CONACyT Fellow. Alfredo Manzano García is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 597467 from CONACyT.

A. González-Hernández and A. Manzano-García contributed equally to the work.

Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/A459>.

Supplemental video content

Video content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/A460>, <http://links.lww.com/PAIN/A461>, and <http://links.lww.com/PAIN/A462>.

Article history:

Received 2 December 2016

Received in revised form 4 May 2017

Accepted 30 May 2017

Available online 19 July 2017

References

- Adan RA, Van Leeuwen FW, Sonnemans MA, Brouns M, Hoffman G, Verbalis JG, Burbach JP. Rat oxytocin receptor in brain, pituitary, mammary gland, and uterus: partial sequence and immunocytochemical localization. *Endocrinology* 1995;136:4022–8.
- Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 2012;488:172–7.
- Bardoni R, Tawfik VL, Wang D, François A, Solorzano C, Shuster SA, Choudhury P, Betelli C, Cassidy C, Smith K, de Nooij JC. Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 2014;81:1312–27.
- Baumbauer KM, DeBerry JJ, Adelman PC, Miller RH, Hachisuka J, Lee KH, Ross SE, Koerber HR, Davis BM, Albers KM. Keratinocytes can modulate and directly initiate nociceptive responses. *Elife* 2015;4:e09674.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Calgioni CS, Oliver C, Jamur MC, Franci CR. Presence of oxytocin receptors in the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones in female rats: a possible direct action of oxytocin on GnRH neurones. *J Neuroendocrinol* 2007;19:439–48.
- Condés-Lara M, González NM, Martínez-Lorenzana G, Delgado OL, Freund-Mercier MJ. Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res* 2003;976:75–81.
- Condés-Lara M, Maie IAS, Dickenson AH. Oxytocin actions on afferent evoked spinal cord neuronal activities in neuropathic but not in normal rats. *Brain Res* 2005;1045:124–33.
- Condés-Lara M, Zayas-González H, Manzano-García A, Córdova-Quiroz E, Granados-Morera J, García-Cuevas M, Morales-Gómez J, González-Hernández A. Successful pain management with epidural oxytocin. *CNS Neurosci Ther* 2016;22:532–4.
- Condés-Lara M, Zayas-González H, Manzano-García A, González-Hernández A. Response to letter to the editor by Eisenach and Yaksh on "successful pain management with epidural oxytocin". *CNS Neurosci Ther* 2016;22:867–8.
- de Araujo AD, Mobli M, Castro J, Harrington AM, Vetter I, Mettehthaler M, Wan J, Lewis RJ, King GF, Brierley SM, Alewwood PF. Selenoether oxytocin analogues have analgesic properties in a mouse model of chronic abdominal pain. *Nat Commun* 2014;5:3165.
- DeLaTorre S, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, Villanueva L, Condés-Lara M. Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: electrophysiological and behavioral evidence. *PAIN* 2009;144:320–8.
- Denda M, Nakatani M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S. Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Exp Dermatol* 2007;16:157–61.
- Denda S, Takei K, Kumamoto J, Goto M, Tsutsumi M, Denda M. Oxytocin is expressed in epidermal keratinocytes and releases upon stimulation with adenosine 5'-[γ-thio]triphosphate in vitro. *Exp Dermatol* 2012;21:535–61.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *PAIN* 1977;4:161–74.
- Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, Ciobanu AC, Triana del Rio R, Roth LC, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demoulière 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, Grinevich V. A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron. Activity and inflammatory pain processing. *Neuron* 2016;89:1291–304.
- Ermisch A, Ruhle HJ, Landgraf R, Hess J. Blood-brain barrier and peptides. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985;5:350–7.
- Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001;81:629–83.
- González-Hernández A, Rojas-Piloni G, Condés-Lara M. Oxytocin and analgesia: future trends. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:549–51.
- Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin revisited: it is also a cardiovascular hormone. *J Am Soc Hypertens* 2008;2:318–25.
- Hammock EAD, Levitt P. Oxytocin receptor ligand binding in embryonic tissue and postnatal brain development of the C57BL/6J mouse. *Behav Neurosci* 2013;7:195.
- Hobo S, Hayashida K, Eisenach JC. Oxytocin inhibits the membrane depolarization-induced in intracellular calcium in capsaicin sensitive neurons: a peripheral mechanism of analgesic action. *Anesth Analg* 2012;114:442–9.
- Harris JA, Hirokawa KE, Sorensen SA, Gu H, Mills M, Ng LL, Bohn P, Mortrud M, Ouellette B, Kidney J, Smith KA, Dang C, Sunkin S, Bernard A, Oh SW, Madisen L, Zeng H. Anatomical characterization of Cre driver mice for neural circuit mapping and manipulation. *Front Neural Circuits* 2014;8:76.
- Jankowski M, Bissonauth V, Gao L, Gangal M, Wang D, Danalache B, Wang Y, Stoyanova E, Cloutier G, Blaise G, Gutkowska J. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. *Bas Res Cardiol* 2010;105:205–18.
- Jasper JR, Harrell CM, O'Brien JA, Pettibone DJ. Characterization of the human oxytocin stably expressed in 293 human embryonic kidney cells. *Life Sci* 1995;57:2253–61.
- Juif PE, Poisbeau P. Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *PAIN* 2013;154:1449–56.
- Kayser V, Elfassi IE, Auel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, Hamon M, Bourgoin S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT_{1A}^{-/-}, 5-HT_{1B}^{-/-}, 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{3A}^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *PAIN* 2007;130:235–48.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992;356:526–9. Erratum in: *Nature*;357:176.
- Kompella UB, Lee VHL. Pharmacokinetics of peptide and protein drugs. In: Lee VHL, editor. *Peptide and protein drug delivery*. Marcel Dekker, Inc, 1991. p. 391–484.
- Kubo A, Shinoda M, Katagiri A, Takeda M, Suzuki T, Asaka J, Yeomans D, Iwata K. Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury through vasopressin-1A receptors of the rat trigeminal ganglia. *PAIN* 2017;158:649–59.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Lozić M, Greenwood M, Šarenac O, Martin A, Hindmarch C, Tasić T, Paton J, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Overexpression of oxytocin receptors in the hypothalamic PVN increases baroreceptor reflex sensitivity and buffers BP variability in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2014;171:4385–98.
- Mack SO, Kc P, Wu M, Coleman BR, Tolentino-Silva FP, Haxhiu MA. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *J Appl Physiol* 2002;92:826–34.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:136–46.
- McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 2010;160:1573–6.
- Mena F, González-Hernández A, Navarro N, Castilla A, Morales T, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. Prolactin fractions from lactating rats elicit effects upon sensory spinal cord cells of male rats. *Neuroscience* 2013;248:552–61.

- [37] Miranda-Cárdenas Y, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana M, Rodríguez-Jiménez J, López-Hidalgo M, Freund-Mercier MJ, Condes-Lara M. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *PAIN* 2006;122:182–9.
- [38] Modi ME, Majchrzak MJ, Fonseca KR, Doran A, Osgood S, Vanase-Frawley M, Feyfant E, McInnes H, Darvari R, Buhl DL, Kablaoui NM. Peripheral administration of a long-acting peptide OT receptor agonist inhibits fear induced freezing. *J Pharm Exp Ther* 2016;358:164–72.
- [39] Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature* 1992;356:523–6.
- [40] Moreno-López Y, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, Rojas-Piloni G. Identification of oxytocin receptor in the dorsal horn and nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Neuropeptides* 2013;47:117–23.
- [41] Petersson M. Cardiovascular effects of oxytocin. *Prog Brain Res* 2002;139:281–8.
- [42] Pinto-Ribeiro F, Ansah OB, Almeida A, Pertovaara A. Influence of arthritis on descending modulation of nociception from the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 2008;1197:63–75.
- [43] Qiu F, Qiu C-Y, Cai H, Liu T-T, Qu Z-W, Yang Z, Li J-D, Zhou Q-Y, Hu W-P. Oxytocin inhibits the activity of acid-sensing ion channels through the vasopressin V1A receptor in primary sensory neurons. *Br J Pharmacol* 2014;171:3065–76.
- [44] Schorscher-Petcu A, Sotocinal S, Ciura S, Dupré A, Ritchie J, Sorge RE, Crawley JN, Hu SB, Nishimori K, Young LJ, Tribollet E, Quirion R, Mogil JS. Oxytocin-induced analgesia and scratching are mediated by the vasopressin-1A receptor in the mouse. *J Neurosci* 2010;30:8274–84.
- [45] Suzuki M, Honda Y, Li MZ, Masuko S, Murata Y. The localization of oxytocin receptors in the islets of Langerhans in the rat pancreas. *Regul Peptides* 2013;183:42–5.
- [46] Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 1983;6:269–324.
- [47] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350–4.
- [48] Tribollet E, Barberis C, Arsenijevic Y. Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 1997;78:499–509.
- [49] Tzabazis A, Mechanic J, Miller J, Klukinov M, Pascual C, Manering N, Carson DS, Jacobs A, Qiao Y, Cuellar J, Frey WH II, Jacobs D, Angst M, Yeomans DC. Oxytocin receptor: expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia* 2016;36:943–50.
- [50] Urch CE, Dickenson AH. In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurons of rats. *Brain Res Protoc* 2003;12:26–34.
- [51] Weston GC, Cann L, Rogers PA. Myometrial microvascular endothelial cells express oxytocin receptor. *Int J Obst Gynaecol* 2003;110:149–56.
- [52] Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;104:35–44.
- [53] Williams PD, Anderson PS, Ball RG, Bock MG, Carroll L, Chiu SH, Clineschmidt BV, Culberson JC, Erb JM, Evans BE, Fitzpatrick SL, Freidinger RM, Kaufman MJ, Lundell GF, Murphy JS, Thompson KL, Veber DF. 1-((7,7-Dimethyl-2(S)-(2(S)-amino-4-(methylsulfonyl)butylamido) 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* 1994;37:565–71.
- [54] Wolfe M, Wisniewski H, Ibañez G, Tariga H, Hargrove D, Lindstrom BF. Peripheral vasopressin type 1a receptors mediate locomotor inhibition following systemic oxytocin administration in rats. 323.12/M40. In: *Neuroscience meeting planner*. Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2015. Online.
- [55] Wrobel L, Schorcher-Petcu A, Dupré A, Yoshida M, Nishimori K, Tribollet E. Distribution and identity of neurons expressing the oxytocin receptor in the mouse spinal cord. *Neurosci Lett* 2011;495:49–54.
- [56] Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, Kimura T, Young LJ, Onaka T, Nishimori K. Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 2009;29:2259–71.
- [57] Yu SQ, Lundeberg T, Yu LC. Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Res* 2003;983:12–22.
- [58] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *PAIN* 1983;16:109–10.