



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN ESPINAL DE
OXITOCINA EN MODELOS DE DOLOR PERSISTENTE Y SU POSIBLE MECANISMO
DE ACCIÓN INTRACELULAR EN LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS ZÚÑIGA

DIRECTOR DE TESIS

**DR. ABIMAEEL GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. MARTHA LEÓN OLEA
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA**

**DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

JURIQUILLA, QUERÉTARO, OCTUBRE DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

La realización de esta tesis doctoral fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado con número 473204, así como a través de los proyectos CONACyT (A1-S-23631) y PAPIIT-UNAM (IA203119).

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Dolor	5
2.2. Dolor conductual	5
2.3. Tratamientos para el manejo del dolor	5
2.4. Clasificación del dolor	6
2.5. Neurofisiología del dolor	7
2.6. Fibras nerviosas encargadas de la transmisión de la señal dolorosa	7
2.6.1. Aferentes primarias	7
2.6.2. Vías ascendentes	9
2.7. Modulación de la nocicepción en la médula espinal	10
2.7.1. Mecanismos moduladores de la nocicepción	10
2.7.2. Neuromediadores involucrados en la modulación del dolor	10
2.7.2.1. <i>Noradrenalina</i>	10
2.7.2.2. <i>Serotonina</i>	11
2.7.2.3. <i>GABA</i>	11
2.7.2.4. <i>Opioides</i>	11
2.7.2.5. <i>Endocannabinoides</i>	12
2.7.2.6. <i>Oxitocina (OXT)</i>	12
2.7.2.6.1. <i>Receptor a oxitocina (OTR) y antinocicepción</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	16
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVOS	17
6.1. Objetivo general	17
6.2. Objetivos específicos	17
7. MÉTODOS	18
7.1. Animales	19
7.2. Fármacos	20
7.3. Aproximación experimental 1: efecto de la administración recurrente de OXT en un modelo de dolor neuropático	21
7.3.1. Procedimientos generales	21
7.3.2. Pruebas conductuales	24
7.3.2.1. <i>Procedimiento para evaluar alodinia táctil</i>	24
7.3.2.2. <i>Procedimiento para evaluar hiperalgesia térmica</i>	27

7.3.2.3.	<i>Procedimiento para evaluar hiperalgesia mecánica</i>	27
7.3.3.	Registros electrofisiológicos <i>in vivo</i>	28
	7.3.3.1. <i>Procedimiento quirúrgico (laminectomía)</i>	28
	7.3.3.2. <i>Registros extracelulares unitarios de neuronas de amplio rango dinámico (WDR)</i>	28
	7.3.3.3. <i>Estimulación mecánica o eléctrica del campo receptivo</i>	29
7.3.4.	Análisis de datos	29
7.4.	Aproximación experimental 2: Evaluación del posible mecanismo de acción de la administración espinal de OXT en el modelo de la formalina	31
7.4.1.	Procedimiento general	32
7.4.2.	Diseño experimental	32
7.4.3.	Análisis de datos	34
7.5.	Aproximación experimental 3: Efecto de la administración de OXT en conductas espontáneas en un modelo de dolor postquirúrgico	35
7.5.1.	Incisión plantar como un modelo de dolor postquirúrgico	35
	7.5.1.1. <i>Respuestas de retiro inducidas por filamentos de von Frey</i>	36
	7.5.1.2. <i>Evaluación de la actividad espontánea</i>	36
7.5.2.	Diseño experimental	37
7.5.3.	Análisis de datos	38
8.	RESULTADOS	39
8.1.	Aproximación experimental 1: Efecto de la administración recurrente de OXT en un modelo de dolor neuropático	39
8.1.1.	Experimentos conductuales	39
	8.1.1.1. <i>Protocolo 1: La estimulación eléctrica del NPV o la administración i.t. de OXT revierte la alodinia táctil.</i>	39
	8.1.1.2. <i>Protocolo 2: Efecto de la administración recurrente intratecal (i.t.) o intraplantar (i.pl.) de OXT en un modelo de dolor neuropático</i>	39
8.1.2.	Experimentos electrofisiológicos	42
	8.1.2.1. <i>Protocolo 2: La administración espinal de OXT parece disminuir la actividad neuronal evocada de las neuronas WDR 25 días (o más) después de la ligadura de los nervios espinales</i>	42
	8.1.2.2. <i>Protocolo 3: La estimulación eléctrica del NPV o la administración espinal de OXT disminuye la actividad neuronal evocada de las neuronas WDR entre 15 y 17 días después de la ligadura de los nervios espinales</i>	44
8.2.	Aproximación experimental 2: Evaluación del posible mecanismo de acción de la administración espinal de OXT en el modelo de la formalina	46
8.2.1.	Efecto de la administración de OXT o de la estimulación del NPV en la nocicepción temprana y tardía inducida por la formalina	46

8.2.2.	Efecto de la administración de OXT o de la estimulación del NPV en la nocicepción temprana (fase I y II) y tardía (fase III) inducida por formalina	46
8.2.3.	Efecto del L-368,899, PTX, galeina y U-73122 en la antinocicepción temprana y tardía inducida por la OXT	46
8.2.4.	Efecto del L-NAME, ODQ o glibenclamida en la antinocicepción temprana inducida por OXT	49
8.3.	Aproximación experimental 3: Efecto de la administración de OXT en conductas espontáneas en un modelo de dolor postquirúrgico	50
8.3.1.	Efectos de la OXT sobre los umbrales mecánicos en un modelo de dolor postquirúrgico	50
	8.3.1.1. <i>Umbrales mecánicos después de la incisión plantar</i>	50
	8.3.1.2. <i>La OXT espinal disminuye la hiperalgesia mecánica inducida por incisión plantar</i>	50
8.3.2.	Actividad espontánea en los animales control	52
	8.3.2.1. <i>Efecto de la incisión plantar sobre la actividad ambulatoria</i>	52
	8.3.2.2. <i>Efecto de la incisión plantar sobre la distancia total recorrida</i>	54
	8.3.2.3. <i>Efecto de la incisión plantar sobre la actividad vertical</i>	54
	8.3.2.4. <i>La OXT espinal mejora la actividad espontánea</i>	54
9.	DISCUSIÓN	56
9.1.	La administración recurrente de OXT inhibe la nocicepción	56
9.2.	Posible mecanismo de acción en el efecto antinociceptivo de la OXT	58
9.3.	Efecto de la administración de la OXT en las conductas evocadas y espontáneas posteriores a una intervención quirúrgica	61
10.	CONCLUSIÓN	65
	REFERENCIAS	66
	APÉNDICE	83
A.	Efectos <i>per se</i> de los antagonistas usados en la prueba de la formalina	83
B.	Lista de publicaciones y resúmenes en congresos	84
C.	Publicaciones derivadas de la presente tesis experimental.	84

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por facilitar recursos, herramientas y asignaturas que fueron fundamentales para mi formación.

Me gustaría agradecer a mi tutor de tesis el Dr. Abimael González Hernández, ya que, con dedicación, paciencia y perseverancia, así como su motivación por el trabajo fue y es una parte fundamental para mi formación como investigador. Gracias Dr. por los conocimientos brindados y los consejos ofrecidos que serán de ahora en adelante los cimientos para mi vida profesional.

Al Dr. Miguel Condés Lara que fue el que me abrió las puertas de su laboratorio para continuar por este camino de la investigación, gracias por su compañía, sus consejos y el apoyo brindado en los momentos difíciles.

Agradezco de todo corazón a mi comité tutorial, la Dra. Martha León Olea, la Dra. María Teresa Morales Guzmán y al Dr. Manuel Salas Alvarado, gracias por su atención, paciencia y motivación, ha sido un privilegio contar con su guía y su apoyo, gracias por los consejos compartidos y en especial por el tiempo brindado.

A la Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana, por su apoyo tanto técnico como personal, por esos consejos y pláticas, por las risas y las recomendaciones para ser un mejor investigador.

A la Unidad de Análisis Conductual del Instituto de Neurobiología, en especial a la Dra. Deisy Gasca Martínez por el apoyo y dirección brindados para la realización de los experimentos de esta tesis.

A mis padres Laura y Juan que siempre me impulsaron a seguir en este camino, por sus consejos y apoyo, que sin ustedes no hubiera podido llegar tan lejos.

A mis hermanos Iván y Alejandro, que no importando las peleas, siempre tenían una palabra o un gesto de apoyo para conmigo en este camino que decidí tomar ya hace cuatro años.

A mis amigos del laboratorio B-16 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, que compartieron largas horas de su tiempo ya fuera para trabajar o reír.

ABREVIATURAS

5-HT: 5-Hidroxitriptamina o serotonina

AC: Adenilato Ciclasa

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

ATP: Adenosina trifosfato

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

DMSO: Dimetilsulfóxido

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GCs: Guanilato ciclasa soluble

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

HPA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (por sus siglas en inglés)

i.pl.: Administración intraplantar

i.t.: Administración intratecal

K_{ATP}: Canales de potasio sensibles a ATP

LC: Locus coeruleus

L-NAME: N ω -nitro-L-arginina-metil-éster

LTP: Potenciación a largo plazo

NO: Óxido nítrico

NOS: Sintasa del óxido nítrico

NPV: Núcleo paraventricular del hipotálamo

ODQ: H-(1,2,4)-oxidiazol[4,2-a] quinoxalin-1-onea

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTR: Receptor a oxitocina

OXT: Oxitocina

PAG: Sustancia gris periacueductal

PLC β : Fosfolipasa C β

POM: Parte medial del tálamo posterior

PTX: Toxina *Pertussis*

RVM: Médula rostral ventromedial
SHAM: Ratas falsamente operadas
SNC: Sistema nervioso central
SNL: Ligadura de los nervios espinales
SNP: Sistema nervioso periférico
VPL: Núcleo talámico ventropostero-lateral
WDR: Neurona de amplio rango dinámico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escalera terapéutica de la OMS.	6
Figura 2. Tipos de fibras sensoriales.	7
Figura 3. Sistemas de transmisión de la información inocua y nociva.	9
Figura 4. Conexiones del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV).	13
Figura 5: Modelos de dolor empleados en la tesis y las modalidades de dolor que abarcan.	19
Figura 6. Grupos experimentales utilizados en la primera aproximación experimental.	22
Figura 7. Ligadura de nervios espinales (SNL).	23
Figura 8. Inyección intratecal (método de Mestre).	24
Figura 9. Método para determinar el umbral de retiro de la pata.	25
Figura 10. Grupos experimentales utilizados en la segunda aproximación experimental.	31
Figura 11. Grupos experimentales utilizados en la tercera aproximación experimental.	35
Figura 12. Modelo de incisión plantar.	36
Figura 13. La estimulación eléctrica repetitiva del NPV o la administración espinal de OXT revierte la alodinia táctil inducida por SNL.	40
Figura 14. La OXT espinal o periférica revierte la alodinia táctil inducida por SNL.	40
Figura 15. La OXT espinal o periférica revierte la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por SNL.	41
Figura 16. Efecto de la estimulación eléctrica del NPV sobre la actividad neuronal de células WDR de ratas con SNL.	43
Figura 17. Registro de células WDR e histograma peri-estímulo en ratas con más de 25 días después de la SNL.	44
Figura 18. Efecto de la OXT espinal sobre la actividad neuronal de las células WDR en ratas con 15-17 días posteriores a la SNL.	45
Figura 19. La OXT espinal o la estimulación eléctrica del NPV inhibe la nocicepción temprana (0 – 1 h) y tardía (>3 días) inducida por formalina al 1%	47
Figura 20. El bloqueo del OTR inhibe la antinocicepción temprana (0 – 1 h) y tardía (>3 días) que se induce por la OXT espinal probablemente por la activación diferencial de dos proteínas G.	48
Figura 21. El papel de la vía OTR/PLC/NO/K _{ATP} en la antinocicepción temprana (0 – 1 h) inducida por OXT.	49
Figura 22. La administración espinal de OXT disminuyó el dolor evocado en un modelo de dolor postquirúrgico.	51
Figura 23. Actividad ambulatoria y mapas de calor representativos de diferentes tratamientos antes y después del procedimiento quirúrgico.	53
Figura 24. La OXT espinal mejora el comportamiento espontáneo.	55

Apéndice

Figura suplementaria 1. Efectos <i>per se</i> del L-368,899, PTX, GAL y U-73122 sobre la nocicepción inducida por formalina.	81
Figura suplementaria 2. Efecto <i>per se</i> del L-NAME, ODQ y glibenclamida sobre la nocicepción inducida por formalina	81

RESUMEN

A nivel espinal la oxitocina (OXT) inhibe la transmisión nociceptiva, y en humanos, la administración epidural de OXT tiene efectos analgésicos. Estos hallazgos destacan el papel de la OXT como agente analgésico, sin embargo, la recurrencia del efecto antinociceptivo y los mecanismos intracelulares se desconocen.

La presente tesis explora el efecto antinociceptivo recurrente de la administración de OXT en ratas con ligadura en los nervios espinales (SNL), un modelo de dolor neuropático. Además, analiza el mecanismo intracelular espinal de la OXT en la prueba de la formalina y su potencial efecto como analgésico preventivo en un modelo de dolor postquirúrgico.

En ratas con SNL, la administración recurrente de OXT (espinal o periférica) redujo la alodinia táctil (evaluada con filamentos de von Frey) y aumentó el tiempo de latencia en las pruebas de Hargreaves y Randall-Sellito (*i.e.* menos hiperalgesia térmica y mecánica). Además, la administración espinal de OXT disminuyó la frecuencia de disparo de las fibras A δ y C en experimentos electrofisiológicos.

Usando la prueba de la formalina se evaluaron los mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo de la OXT. Esta prueba induce una respuesta inmediata (0-1 h; sacudidas de pata) y una respuesta tardía (3-30 días; hipersensibilidad mecánica), lo que permite observar efectos a corto y largo plazo. La OXT disminuyó la nocicepción inmediata y tardía inducidas por la formalina; ambos efectos fueron bloqueados por el L-368,899 (antagonista del receptor a OXT, el OTR). La antinocicepción inmediata fue inhibida por el U-73122, L-NAME, ODQ o glibenclamida (inhibidores de la fosfolipasa C β , óxido nítrico sintasa, guanilato ciclasa y de los canales K_{ATP}, respectivamente), pero no por la toxina *Pertussis* o galeina (inhibidores de proteínas G_i y de las subunidades G $\beta\gamma$). Por otra parte, la antinocicepción tardía de la OXT fue revertida por la toxina *Pertussis* o galeina.

Dado que la OXT inhibió la nocicepción tardía, se evaluó el efecto de este neuropéptido en un modelo de dolor posquirúrgico. En el modelo de incisión plantar, la administración espinal de OXT, previo a la incisión, disminuyó la nocicepción evocada (hiperalgesia), mientras que la actividad espontánea (actividad ambulatoria, vertical y horizontal) que se abate por la cirugía se restaura con el pretratamiento con OXT.

En resumen, la administración recurrente de OXT disminuye la hipersensibilidad que se induce en condiciones de dolor neuropático. Los datos también sugieren que la antinocicepción inmediata y tardía de la OXT se lleva a cabo por dos cascadas intracelulares distintas, ambas mediadas por el OTR. El efecto inmediato se lleva a través de la vía PLC-NO-GMPc-K_{ATP}; mientras el efecto tardío a través del reclutamiento de proteínas G_i, así como de las subunidades G $\beta\gamma$. Finalmente, la administración espinal de OXT antes de un procedimiento quirúrgico no sólo reduce la hiperalgesia táctil causada por la incisión, sino que también restaura las conductas espontáneas de los animales. Estos datos en su conjunto proporcionan una base para abordar la relevancia terapéutica de la OXT en el tratamiento del dolor.

ABSTRACT

At the spinal level, oxytocin (OXT) inhibits nociceptive transmission. In humans, epidural administration of OXT has analgesic effects. These findings highlight the role of OXT as an analgesic agent; however, the recurrence of the antinociceptive effect and the intracellular mechanisms remain unknown.

The present thesis explores the recurrent antinociceptive effect of the administration of OXT in rats with spinal nerve ligation (SNL), a model of neuropathic pain. In addition, it analyzes the spinal intracellular mechanism induced by OXT in the formalin test and its potential effect as a preventive analgesic in a postsurgical pain model.

In SNL rats, recurrent administration of OXT (spinal or peripheral) reduced tactile allodynia (assessed with von Frey filaments) and increased time latency in the Hargreaves and Randall-Sellito tests (i. e., less thermal and mechanical hyperalgesia were observed). Furthermore, spinal administration of OXT decreased the firing frequency of A δ and C fibers, as shown by electrophysiological experiments.

Using the formalin test, the mechanisms involved in the antinociceptive effect of OXT were evaluated. This test induces an immediate response (0-1 h; paw twitching) and a delayed response (3-30 days; mechanical hypersensitivity), allowing to observe short and long-term effects induced by OXT. This peptide decreased formalin-induced immediate and late nociception; both effects were blocked by L-368,899 (OXT receptor antagonist, OTR). Immediate antinociception was inhibited by U-73122, L-NAME, ODQ, or glibenclamide (inhibitors of phospholipase C, nitric oxide synthase, guanylate cyclase, and K_{ATP} channels, respectively), but not by Pertussis toxin or galein (inhibitors G_i proteins and G _{$\beta\gamma$} subunits). On the other hand, late antinociception by OXT was only reversed with *Pertussis* toxin or galein.

Since OXT inhibited late nociception, the effect of this neuropeptide was evaluated in a post-surgical pain model. In the plantar incision model, spinal administration of OXT, before the incision, decreased the evoked nociception (hyperalgesia), while the spontaneous activity (ambulatory, vertical, and horizontal activity) was improved.

In summary, recurrent administration of OXT decreases hypersensitivity induced under neuropathic pain-like conditions. The data also suggest that the immediate and late antinociception due to OXT treatment is carried out by two distinct intracellular cascades, both mediated by OTR. The immediate effect is attributed to the PLC-NO-cGMP-K_{ATP} pathway; while the late effect through the recruitment of G_i proteins, and the G _{$\beta\gamma$} subunits. Finally, spinal administration of OXT before a surgical procedure not only reduced tactile hyperalgesia caused by the incision and restored the spontaneous behavior of the animals. Together, these data provide a basis for addressing the therapeutic relevance of OXT in pain treatment.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las sintomatologías agudas y crónicas que afectan a la población y es de relevancia en la salud pública por su gran incidencia es el dolor (Clark et al., 2013). El dolor, permite apartarnos de situaciones peligrosas a medida que nos alejamos de los estímulos nocivos, también, previene un daño mayor al escapar de los estímulos dañinos que causan dolor después de una agresión inicial, además, promueve el proceso de curación ya que se protege la parte del cuerpo que fue dañada. Según Woolf (2010), el dolor se puede dividir, por su temporalidad, en dos categorías principales: dolor agudo, que va de 1 segundo a 3 meses y crónico, cuando supera los 3 meses de prevalencia

El dolor agudo o nociceptivo es parte de un relé de advertencia rápido que instruye a las neuronas motoras del sistema nervioso central para minimizar el daño físico detectado. A nivel periférico está mediado por las fibras sensoriales A δ y C, también denominadas nociceptores. Estos nociceptores son terminaciones nerviosas libres que terminan justo debajo de la piel y órganos del cuerpo. Sirven para detectar estímulos nocivos cutáneos, somáticos y viscerales. Ciertamente, el proceso de nocicepción se puede asociar con daño nervioso causado por traumatismos, enfermedades como diabetes, herpes, síndrome del intestino irritable, cáncer en etapa tardía o los efectos tóxicos de la quimioterapia, y como tal, puede ser agudo o crónico.

El dolor crónico, sin embargo, y al margen de la disputa, podríamos considerar que no cumple ninguna función biológica ya que no es síntoma de un proceso patológico, sino que es un proceso patológico en sí mismo. Hay dos tipos de dolor crónico: dolor nociceptivo inflamatorio y dolor neuropático. El dolor inflamatorio se asocia con daño tisular y el proceso inflamatorio resultante. Mientras que, el dolor neuropático está asociado a daño neuronal.

Clínicamente, para su estudio el dolor puede clasificarse por su neurofisiopatología en: nociceptivo, funcional, inflamatorio y neuropático. El dolor nociceptivo describe aquel dolor debido a daño tisular real o potencial y es el dolor más común; el segundo, se presenta como una sensación dolorosa sin la existencia aparente de un daño que lo ocasione (i.e. fibromialgia); el tercero, es una hipersensibilidad (alodinia e hiperalgesia) que se origina como una respuesta a un daño tisular con la subsecuente liberación de sustancias proinflamatorias (i.e. dolor postquirúrgico); finalmente, el dolor neuropático surge como consecuencia directa de una lesión o enfermedades que afectan el sistema somatosensorial, generando una hipersensibilización a estímulos nocivos (hiperalgesia) y no nocivos (alodinia) que pueden ocurrir de forma continua y/o episódica (Treede et al., 2008; Woolf, 2010).

Es debido a esta complejidad y que, aun cuando para el tratamiento del dolor existe una amplia variedad de agentes farmacológicos, no todos son efectivos o presentan efectos adversos que limitan su uso (Finnerup et al., 2005). Por lo anterior, la búsqueda, evaluación y caracterización de moléculas con potencial efecto analgésico resulta esencial.

Evidencia reciente sugiere que la oxitocina (OXT) podría desempeñar un papel clave como una molécula analgésica en el sistema nervioso central (SNC) (Arletti et al., 1993; Lundeberg et al., 1993; Petersson et al., 2001; Condés-Lara et al., 2003, 2005, 2006, 2012; Wang et al., 2003; Yu et al., 2003; Miranda-Cardenas et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2007; Yang et al., 2007; Han y Yu, 2009; Mazzuca et al., 2011; Eliava et al., 2016). Estudios preliminares mostraron que las neuronas que contienen OXT en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) envían axones a la médula espinal (Sawchenko y Swanson, 1982) y que la estimulación eléctrica de este núcleo induce antinocicepción o analgesia conductual (Shiraishi et al., 1995; Condés-Lara et al., 2006; Yang et al., 2006; Eliava et al., 2016). Un reporte previo en humanos con dolor crónico intratable secundario a cáncer metastásico, demostró que la OXT administrada de manera epidural tiene efectos analgésicos (Condés-Lara et al., 2016), lo que refuerza el potencial terapéutico de este neuropéptido. Aparte del efecto analgésico central de la OXT, estudios recientes en roedores han descrito la posibilidad de un mecanismo periférico específico dependiente de OXT (Juif y Poisbeau, 2013; de Araujo et al., 2014; Eliava et al., 2016; González-Hernández et al., 2017; Boada et al., 2019).

Bajo estos antecedentes y aun cuando se ha demostrado de forma consistente que la OXT tiene un efecto antinociceptivo, se desconoce: (i) si la administración recurrente de OXT mantendrá su efecto antinociceptivo; (ii) la naturaleza de los mecanismos intracelulares *in vivo* que se activan por la OXT; y (iii) su probable efecto antinociceptivo preventivo. La presente tesis se enfocó responder los puntos antes mencionados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Dolor

La asociación internacional para el estudio del dolor (IASP) define al dolor como *“una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño”* (Merskey, 1979). De manera reciente Williams y Craig (2016), han propuesto una nueva definición donde definen al dolor como *“una experiencia angustiante asociada con daño tisular real o potencial con componentes sensoriales, emocionales, cognitivos y sociales”*. En cualquier caso, el dolor, aunque indeseable, representa una estrategia que protege al organismo de los peligros del exterior. Sin embargo, en algunos casos, el dolor pasa de cumplir un papel benéfico a convertirse en una patología que debe ser suprimida para permitir la buena calidad de vida del organismo (Gomezese Ribero et al., 2010).

2.2 Dolor conductual

El dolor después de una lesión o de un procedimiento quirúrgico cambia el accionar de los individuos, ya que cambian su comportamiento, evitando ciertos movimientos que intensifican el dolor (i.e. evitar el mayor movimiento/desplazamiento posible, acostarse sobre un lado específico, disminuir el movimiento de una extremidad o evitar poner carga sobre la zona afectada) o asumiendo en muchos casos una posición corporal que disminuya la sensación. Estos comportamientos son gratificantes debido a que causan una disminución del dolor. También, la manifestación conductual del dolor puede verse reforzada por los comportamientos del individuo con su entorno (Gorczyca et al., 2013). Es por eso que el tratamiento contra el dolor debe ser capaz de disminuir el cambio conductual o de restaurar las conductas previas a la lesión o daño que está provocando el dolor.

2.3 Tratamientos para el manejo del dolor

Una de las estrategias para el control del dolor es a través del uso de fármacos. Basándose en la “escalera de analgesia” propuesta por la OMS, actualmente para el tratamiento del dolor, la estrategia farmacológica se ilustra en la Fig. 1. El primer escalón es ocupado por los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y fármacos no opioides (como los inhibidores de la ciclooxigenasa, COX), el segundo escalón son los fármacos opioides débiles y el tercero por los opioides propiamente dichos (Kumar, 2007). Sin embargo, hay dolores como lo es el dolor neuropático que por su naturaleza requieren de un tratamiento distinto, esto debido a que el tratamiento convencional resulta ineficaz (Dworkin et al., 2007; O’Connor y Dworkin, 2009).

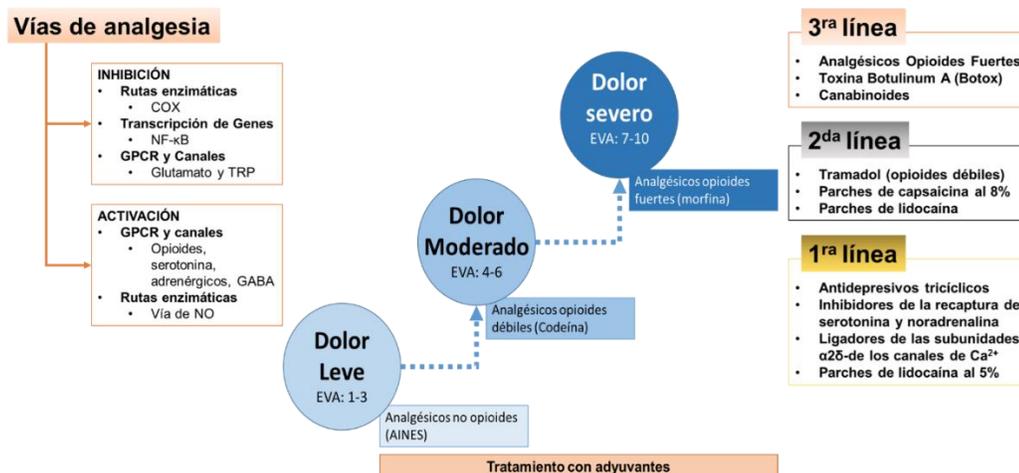


Figura 1. Escalera terapéutica de la OMS. (Modificado de (Guerrero-Alba et al., 2018))

Para esto se emplean una extensa variedad de agentes farmacológicos incluyendo antidepresivos (inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina), anticonvulsivos (bloqueadores de la actividad de canales de Ca^{2+}), opioides (que actúen sobre los diferentes receptores opioides), agentes tópicos (como la lidocaína), entre otros (Caraceni et al., 1999; Eckhardt et al., 2000; Portenoy, 2000; Watson, 2000; Attal, 2001).

En términos generales, el dolor puede ser causado por una variedad de factores y aun cuando sus mecanismos han sido vastamente estudiados, estos no son del todo claros, razón por la cual se emplean una amplia variedad de agentes farmacológicos, que sin embargo pueden acarrear una diversidad de efectos secundarios y adversos (Finnerup et al., 2005). Por otra parte, en el caso particular de los opioides se puede presentar tolerancia a los tratamientos (Clark et al., 2013). Es por lo que la evaluación de nuevas moléculas con potencial efecto analgésico resulta esencial.

2.4 Clasificación del dolor

Para su estudio el dolor puede clasificarse por su (i) temporalidad, en agudo que va desde 1 segundo a tres meses o crónico cuando supera los tres meses de prevalencia (Woolf, 2010); y/o por su (ii) neurofisiopatología en nociceptivo, inflamatorio, funcional y neuropático, siendo el primero como una respuesta fisiológica secundaria experimentada por la activación normal de nociceptores (mecánico, térmico o químico), el segundo, como una respuesta a un daño con la subsecuente liberación de citocinas y sustancias proinflamatorias, el tercero, como una sensación dolorosa perceptible pero sin la existencia de un daño que lo ocasione, mientras que el cuarto se produce como una respuesta a una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso periférico (SNP) o SNC y por tanto está asociado a trastornos motores y sensitivos (Gao y Ji, 2010; Nakagawa y Kaneko, 2010; Woolf, 2010).

2.5 Neurofisiología del dolor

La nocicepción cumple un papel fundamental en la supervivencia de las especies, ya que alerta de posibles daños y peligros, por lo que su estudio es de interés, debido a que los fenómenos que subyacen a su transmisión son particularmente complejos (Julius y Basbaum, 2001). Desde el punto de vista anatómico-funcional, el principal sistema de transmisión nociceptivo, comprende tres neuronas dispuestas en serie, denominadas neuronas de primer, segundo y tercer orden, las cuales transmiten la información sensorial desde los órganos periféricos (piel, articulaciones, músculos, vísceras), a través de las denominadas fibras aferentes primarias hasta las estructuras del sistema nervioso central encargadas de la discriminación, la integración y el procesamiento del dolor (Kohama et al., 2000; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001).

2.6 Fibras nerviosas encargadas de la transmisión de la señal dolorosa

2.6.1 Aferentes primarias

Las fibras aferentes primarias o fibras sensoriales están constituidas por los axones de las neuronas de primer orden, cuyo cuerpo celular está localizado en los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal o en los ganglios sensoriales de los nervios craneales V, VII, IX y X (Cingolani y Houssay, 2000). Del cuerpo celular de estas neuronas emergen dos prolongaciones, una larga que termina ramificándose a nivel distal en la piel o en otros tejidos, la cual constituye la fibra aferente primaria y otra prolongación más corta, que se dirige hacia el asta dorsal de la médula espinal o tallo cerebral, donde conecta con neuronas de segundo orden. Las fibras sensoriales (Fig. 2) pueden tener una capa de mielina o carecer de esta, así mismo se clasifican según su diámetro (condicionado por la capa de mielina) y velocidad de conducción (Cingolani y Houssay, 2000).

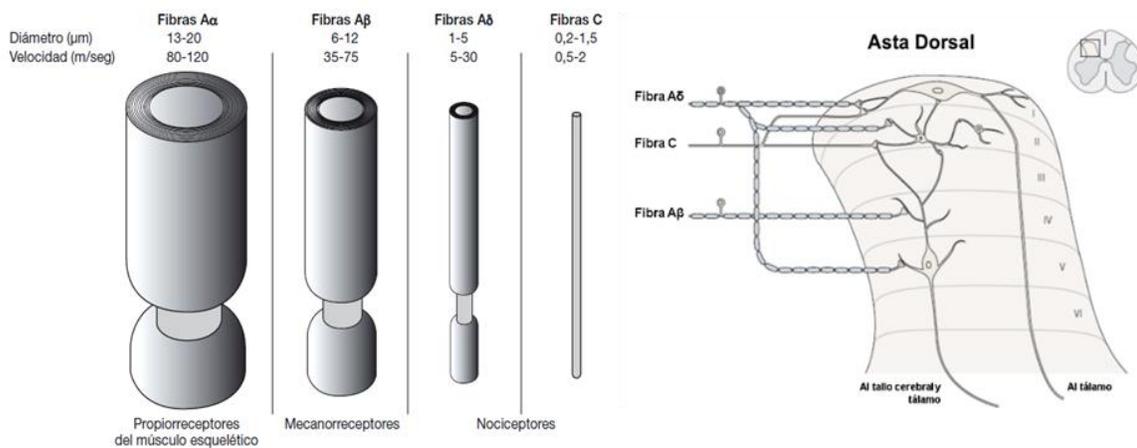


Figura 2. Tipos de fibras sensoriales. Estas fibras se pueden clasificar según su diámetro, velocidad de conducción y los receptores a los que se asocian (izquierda). Modificado de Bear et al., 2016. Entrada de fibras aferentes en el asta dorsal de la médula espinal (derecha). Modificado de Kandel et al., 2014.

En condiciones normales se considera que las fibras sensoriales que intervienen en la transmisión nociceptiva fisiológica son las fibras A δ y C (Kohama et al., 2000; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001). Estas fibras, también denominadas nociceptores, actúan como receptores sensoriales de alto umbral del sistema nervioso somatosensorial periférico y son capaces de transducir y codificar estímulos nocivos. En la periferia, estos nociceptores forman ramificaciones nerviosas libres, a diferencia de otras fibras aferentes primarias (como las fibras A β) cuyas terminaciones son receptores sensoriales los cuales forman estructuras complejas (e.g. corpúsculos de Pacini, Meissner, Ruffini y discos de Merkel) (Cingolani y Houssay, 2000; Kohama et al., 2000).

En el caso de las aferentes primarias nociceptivas que inervan el asta dorsal de la medula espinal, éstas entran a la médula a través de la raíz dorsal y hacen conexiones con neuronas de segundo orden ya sea directa o indirectamente a través de interneuronas espinales (Coggeshall et al., 1997; Kohama et al., 2000; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001).

En el asta dorsal se pueden identificar dos tipos básicos de neuronas nociceptivas de segundo orden, las cuales se clasifican según la naturaleza de su respuesta a las entradas sensoriales en:

- a) Las neuronas propiamente nociceptivas que se concentran en la lámina I y responden a estímulos nocivos de tipo mecánico y térmico, pero no a estímulos inocuos, siendo sus principales aferentes las fibras A δ y C (que conectan con las neuronas de segundo orden de tipo nociceptivo y polimodales, respectivamente) (Cingolani y Houssay, 2000). Estas neuronas se asocian con el dolor punzante y quemante (Coggeshall et al., 1997; Kohama et al., 2000; Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001).
- b) Las neuronas de amplio rango dinámico (WDR), que predominan en la lámina V y que se consideran polimodales ya que no sólo responden a estímulos inocuos, sino también a estímulos nocivos. A menudo también responden a estímulos térmicos y químicos nocivos. (Schmidt y Willis, 2007; Le Bars y Cadden, 2008). Este tipo de neuronas reciben aferencias de fibras nociceptivas A δ y C, así como de fibras sensoriales no nociceptivas del tipo A β ; por lo que son capaces de responder a una gran variedad de estímulos tanto inocuos como nocivos (Le Bars y Cadden, 2008).

En este sentido, los axones de las neuronas de segundo orden constituyen el puente de comunicación entre la periferia y el sistema nervioso central ya que constituyen las vías de transmisión sensorial ascendente de la médula espinal hacia regiones supraespinales (Ji y Woolf, 2001; Julius y Basbaum, 2001).

2.6.2 Vías ascendentes

La información sensorial está dividida en función de sus características. La información inocua como lo es el tacto, la presión, vibración o propioceptiva, se transmite por el sistema de columnas dorsales (Fig. 3 izquierda), el cual está formado por los axones de las neuronas de segundo orden de las láminas profundas del asta dorsal (IV- IX) y de la lámina X que ascienden ipsilateralmente hasta proyectar en los núcleos dorsales del bulbo raquídeo, el núcleo *gracilis* y el núcleo *cuneatus* donde cruzan al lado contralateral y ascienden mediante el sistema del *lemniscus* medial hasta conectar con estructuras talámicas como el núcleo ventroposterolateral (VPL) (Cingolani y Houssay, 2000; Mas y Blanch, 2007; Kandel y Schwartz, 2013).

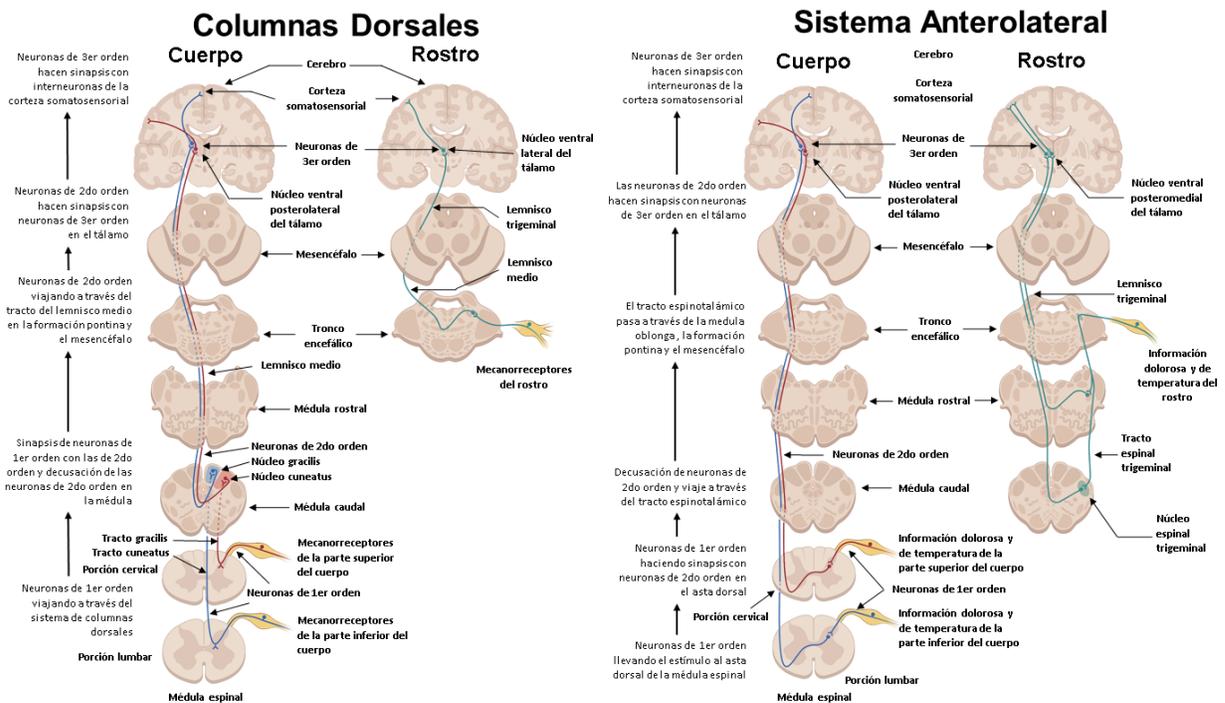


Figura 3. Sistemas de transmisión de la información inocua y nociva. Sistema de columnas dorsales transmite la información inocua (tacto, la presión, vibración o propioceptiva); la información sensorial es transmitida por neuronas de 1^{er} orden (principalmente fibras A β) que se internan en la médula y ascienden ipsilateralmente hasta los núcleos gracilis y cuneatus, donde hacen sinapsis con neuronas de 2^o orden, las cuales decusan y ascienden al tálamo, donde neuronas de 3^{er} orden proyectan hacia la corteza somatosensorial. El sistema anterolateral, transmite las señales nociceptivas de la periferia (fibras del tipo A δ o C) hacia el asta dorsal de la médula espinal y hacen un relevo con neuronas de 2^o orden que cruzan la línea media y proyectan al tálamo donde neuronas de 3^{er} orden, al hacer el relevo, llevan la información nociva a la corteza somatosensorial. Modificado de Waxman, 2011.

La información nociceptiva y térmica que procede de la piel, las articulaciones y el músculo, está canalizada en el sistema espinotalámico que corresponde al sistema anterolateral (Mas y Blanch, 2007) (Fig. 3 derecha), dónde los axones de la neuronas aferentes primarias llevan la información hasta la médula espinal dónde establecen

sinapsis con neuronas de segundo orden en la sustancia gris medular principalmente en las láminas I, II y V del asta dorsal de la médula espinal.

Estas neuronas de segundo orden cruzan la línea media hacia el funículo lateral de la sustancia blanca medular y ascienden por el tracto anterolateral hacia el VPL y a la parte medial del tálamo posterior (POm), dónde hacen sinapsis con neuronas talámicas (neuronas de tercer orden), las cuales proyectan a la corteza somatosensorial (Cingolani y Houssay, 2000; Mas y Blanch, 2007; Kandel y Schwartz, 2013).

2.7 Modulación de la nocicepción en la médula espinal

2.7.1 Mecanismos moduladores de la nocicepción

Una vez codificada la información en la corteza somatosensorial, se activan las vías descendentes que modulan la transmisión nociceptiva. Éstas se originan en la corteza del lóbulo frontal, en el hipotálamo y en estructuras del sistema límbico (e.g. amígdala, núcleo accumbens) para proyectar a nivel del mesencéfalo en la sustancia gris periacueductal (PAG), desde donde proyectan hacia la médula rostral ventromedial (RVM) (Cingolani y Houssay, 2000).

Desde la RVM se pueden ejercer dos tipos de influencias sobre la transmisión nociceptiva, excitadora o inhibitora mediante la proyección de fibras nerviosas descendentes hacia el asta dorsal de la médula espinal (Coggeshall et al., 1997; Julius y Basbaum, 2001).

Clásicamente se ha asumido que las vías excitadoras e inhibitoras descendentes son distintas. Las primeras, son canalizadas al funículo ventrolateral y activan a neuronas de la lámina I, mientras que, las inhibitoras son canalizadas hacia el funículo dorsolateral. En circunstancias fisiológicas la influencia inhibitora es predominante sobre la excitadora (Coggeshall et al., 1997; Julius y Basbaum, 2001).

2.7.2 Neuromedidores involucrados en la modulación del dolor

Como se puede ver, múltiples estructuras y núcleos cerebrales están involucrados en la modulación descendente del dolor, esto conlleva una amplia variedad de neuromedidores (neurotransmisores y neuromoduladores) liberados en la sinapsis que inhiben la transmisión de la señal nociceptiva (Millan, 2002). De forma breve y a nivel de la médula espinal, los principales neuromedidores involucrados son:

2.7.2.1 Noradrenalina: es el principal neuromodulador de las vías adrenérgicas y se sintetiza a partir de la fenilalanina en las terminales nerviosas. Los receptores de este neurotransmisor se pueden dividir en tres tipos α_1 , α_2 y β adrenérgicos, los cuales

pertencen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), excitadoras o inhibitoras (Millan, 2002).

Los receptores α acoplados a proteínas G_q (α_1 -adrenérgicos) o G_s (β -adrenérgicos) se encuentran predominantemente en neuronas postsinápticas, mientras que los receptores acoplados a proteínas G_i (α_2 -adrenérgicos) se encuentran en neuronas presinápticas. En términos generales, la activación de receptores α_2 -adrenérgicos inhiben la entrada de Ca^{2+} y provoca la reducción de la liberación de neurotransmisores excitadores desde la sinapsis teniendo un efecto antinociceptivo (Millan, 2002; Ossipov et al., 2010; Yam et al., 2018).

2.7.2.2 Serotonina: Estudios en roedores sugieren que la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) modula la respuesta nociceptiva (Sufka et al., 1992; Rocha-González et al., 2009). Sin embargo, su participación en el procesamiento del dolor es compleja ya que la 5-HT puede inhibir y/o facilitar la transmisión nociceptiva, dependiendo del tipo de estímulo nociceptivo y de la naturaleza del receptor serotoninérgico expresado a nivel periférico o central (Millan, 2002). Actualmente se conocen 14 subtipos de receptores que dependiendo de su mecanismo transduccional, estructura y función se agrupan en 7 familias; 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇. Con excepción del receptor 5-HT₃ (el cual es un canal iónico), los receptores a 5-HT pertenecen a la superfamilia de receptores GPCR (Flórez et al., 1998; Barnes y Sharp, 1999; Barnes et al., 2009). Particularmente los receptores 5-HT₁ y 5-HT₅ están acoplados a proteínas de tipo $G_{i/o}$ y por lo tanto están involucrados en la inhibición de las señales excitadoras (Francken et al., 2000; Rocha-González et al., 2009).

2.7.2.3 GABA: el ácido γ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor con mayor distribución en el SNC. Puede encontrarse en las interneuronas de la médula espinal, la neocorteza y el cerebelo (Watanabe et al., 2002). Es producido por neuronas GABAérgicas, presentes en el cerebro. Dentro del sistema nervioso, el GABA puede unirse a los receptores ionotrópicos GABA_A o metabotrópicos GABA_B, localizados en las terminales nerviosas presinápticas. Cuando el GABA se une a los receptores GABA_A, hay una entrada de iones Cl^- en las neuronas, lo que reduce el potencial de membrana (i.e. hiperpolarización) y produce un efecto inhibitor. Por otro lado, la unión de GABA a los receptores GABA_B provoca una inhibición de la formación de la adenosina monofosfato cíclico (AMPC), debido a que el receptor GABA_B es un GPCR acoplado preferencialmente a proteínas G_i (Hyland y Cryan, 2010).

2.7.2.4 Opioides: Existen dos péptidos opioides endógenos liberados en las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal: encefalina y dinorfina (Yam et al., 2018).

Estos péptidos inhiben la liberación de neurotransmisores excitadores de las terminales aferentes primarias, reduciendo la excitabilidad de las neuronas y la mitigación general de la sensación de dolor como resultado final. Los receptores opioides, se conocen como receptores μ -opioides (MOR), δ -opioides (DOR) y κ -opioides (KOR).

Estos receptores son del tipo GPCR acoplados a proteínas G_i (Millan, 2002), que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (AC) disminuyendo así la concentración intracelular de AMPc tras su activación. Estos receptores están ampliamente distribuidos tanto en las neuronas aferentes primarias como en las dendritas de las neuronas postsinápticas (Millan, 2002).

2.7.2.5 Endocannabinoides: Estos neuromediadores interactúan con los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB_1) y tipo 2 (CB_2), ambos acoplados a proteínas G_i . El receptor CB_1 se expresa en el cerebro y en la médula espinal (Walker et al., 1999; Pacher et al., 2006), mientras que el CB_2 se expresa preferencialmente en el sistema inmunológico (Pacher y Mechoulam, 2011). La activación de estos receptores inhibe la síntesis de AMPc intracelular, lo que deriva en reducción de la excitabilidad neuronal (Shoemaker et al., 2005; Demuth y Molleman, 2006). Además, la activación del receptor CB_2 inhibe la desgranulación de mastocitos y la liberación de mediadores proinflamatorios; estos efectos se traducen en un mayor efecto antinociceptivo (Pacher y Mechoulam, 2011).

2.7.2.6 Oxitocina (OXT): De forma reciente, se ha propuesto que la OXT también forma parte del sistema de analgesia endógena. Este neuropéptido es sintetizado principalmente en las neuronas magnocelulares y parvocelulares del NPV y en el núcleo supraóptico del hipotálamo (Sofroniew y Weindl, 1981; Macdonald y Macdonald, 2010).

A partir de estos núcleos hipotalámicos, la OXT es transportada a través de proyecciones neuronales oxitocinérgicas a áreas tales como el hipocampo, el núcleo accumbens y la amígdala, donde es liberada y actúa como un neuromodulador (Gimpl y Fahrenholz, 2001) (Fig. 4). A nivel central, esta última relación es importante, debido a la participación de la amígdala en el procesamiento de la respuesta hacia las amenazas, el estrés, la ansiedad y la señalización nociceptiva (Crock et al., 2012). Dado que la OXT actúa sobre la amígdala, ésta puede disminuir de forma indirecta la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y por consiguiente inhibir la producción de la hormona del estrés (cortisol). Debido a esta regulación, se ha visto que la OXT atenúa la influencia del estrés y la ansiedad en la señalización nociceptiva (Uvnäs-Moberg y Petersson, 2004).

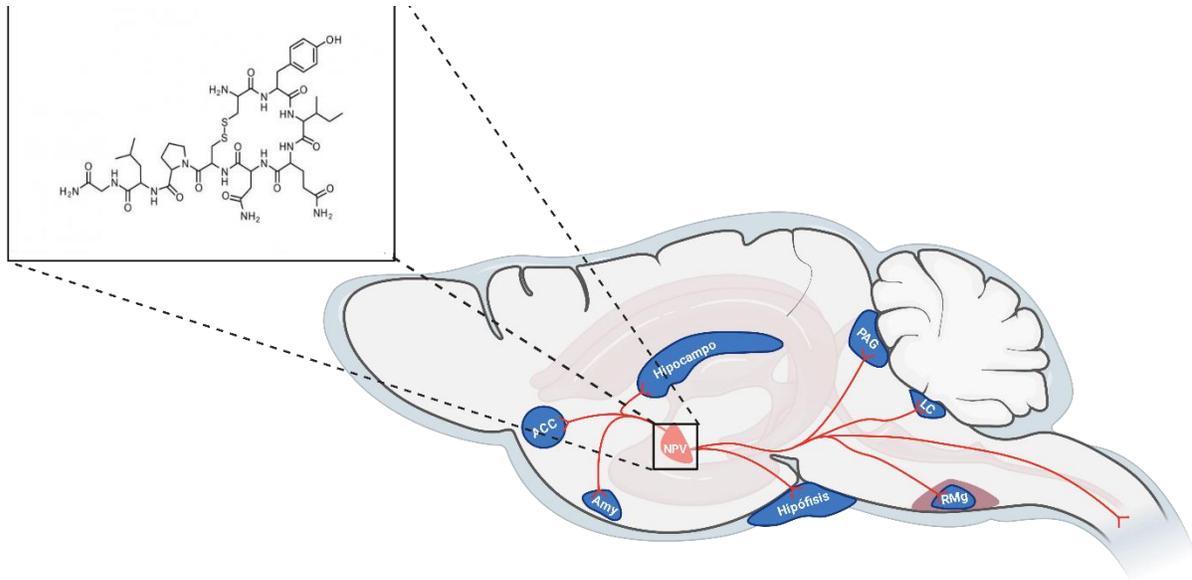


Figura 4. Conexiones del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo. Abreviaciones: PVN: núcleo paraventricular; ACC: Núcleo accumbens; Amy: Amígdala; PAG: Sustancia Gris periacueductal; LC: locus cerúleus; RMg: Núcleo Magno del Rafe. Modificado de Macdonald y Macdonald, 2010.

También, la OXT es capaz de modular las respuestas inflamatorias por medio de una interacción con el sistema opioidérgico (Gu y Yu, 2007; Condés-Lara et al., 2009; Han y Yu, 2009), esto debido a que su acción puede bloquearse por la administración de naloxona, antagonista no selectivo de los receptores a opioides (Ge et al., 2002; Gao y Yu, 2004; Gu y Yu, 2007; Condés-Lara et al., 2009, 2012; Russo et al., 2012). Esto puede deberse a que las interneuronas inhibitoras en el asta dorsal de la médula espinal pueden expresar receptores a la OXT (OTR), una hipótesis que a la fecha no ha sido probada.

Esto implica que el efecto antinociceptivo de la OXT a nivel espinal está mediado a través del reclutamiento de circuitos inhibitorios a nivel de las capas superficiales (Jo et al., 1998; Condés-Lara et al., 2009), que junto con proyecciones directas descendentes de las neuronas hipotalámicas (Swanson y McKellar, 1979; Sofroniew y Weindl, 1981), reducen la señalización aferente y nociceptiva de las fibras A δ y C (Robinson et al., 2002; Condés-Lara et al., 2006, 2008, 2009; Rojas-Piloni et al., 2007, 2007; Juif y Poisbeau, 2013; Gong et al., 2015). Aunado a eso, la administración intracerebroventricular de OXT reduce la hiperalgesia en la prueba de placa caliente (Russo et al., 2012); en humanos se ha demostrado que la administración i.c.v. de este neuropéptido tiene un efecto analgésico potente (Madrazo et al., 1987).

Por otra parte, estudios electrofisiológicos, demostraron que la activación del NPV y del *locus ceruleus* (LC; núcleo noradrenérgico antinociceptivo), incrementa significativamente el efecto antinociceptivo en comparación a cuando sólo se estimula un núcleo (Rojas-Piloni et al., 2012).

Ciertamente, el LC tiene inervación oxitocinérgica proveniente de las neuronas parvocelulares. Estas proyecciones del NPV se acoplan con el núcleo del rafo magno (núcleo serotoninérgico antinociceptivo), promoviendo efectos inhibidores de la transmisión nociceptiva (Condés-Lara et al., 2012).

En experimentos conductuales de dolor neuropático en animales, se demuestra que la administración intratecal (i.t.) de OXT disminuye las conductas nociceptivas (Miranda-Cardenas et al., 2006). Por otra parte, estudios en humanos con dolor crónico y refractario al tratamiento con morfina, sugieren que la administración epidural de OXT alivia eficazmente el dolor (Condés-Lara et al., 2016).

2.7.2.6.1 Receptor a oxitocina (OTR) y antinocicepción

Como se ha mencionado en las secciones anteriores, el efecto de la OXT parece estar mediado por la activación del receptor de OXT (OTR), el cual es un GPCR que puede unir tanto a la OXT como a la vasopresina, debido a la similitud de secuencia entre los péptidos y entre los receptores a OXT y a vasopresina (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

El OTR está funcionalmente acoplado a proteínas del tipo $G_{q/11\alpha}$, que junto con la subunidad $G_{\beta\gamma}$ estimulan a la fosfolipasa C (PLC) y, por lo tanto, la producción de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Ku et al., 1995; Qian et al., 1998). Esta actividad desencadena una cascada de señalización que eventualmente resulta en aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, que, según el tipo de célula, inicia la contracción de los músculos lisos, aumenta la excitabilidad celular, la liberación de neurotransmisores y/o la promoción de la transcripción de genes y la síntesis de proteínas (Ku et al., 1995; Sanborn et al., 1998; Zingg et al., 1998).

Este mecanismo G_q que promueve la liberación de calcio, puede estar relacionado con otra ruta por la cual se ha visto, la OXT puede promover su efecto antinociceptivo, como lo es la vía NO/GMPc/ K_{ATP} observada en experimentos in vitro en células del ganglio de la raíz dorsal (Gong et al., 2015), esta ruta también ha sido asociada a la acción antinociceptiva de moléculas antioxidantes (Izquierdo et al., 2013; de los Monteros-Zuñiga et al., 2016) o de fármacos como la morfina (Cury et al., 2011).

Aunque también, en otros estudios el OTR ha demostrado estar acoplado a proteínas del tipo $G_{i/o}$ (Strakova y Soloff, 1997; Gravati et al., 2010), lo que promovería una disminución de la síntesis de AMPc (Hildebrandt et al., 1983; Sekura et al., 1983), disminuyendo así la excitabilidad neuronal, inhibiendo las señales nociceptivas.

Por otra parte, como ocurre con la mayoría de los GPCR, los receptores a OXT pueden desensibilizarse (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Esta desensibilización depende de la concentración y parece implicar varios mecanismos diferentes: modificaciones postraduccionales que conducen a una pérdida de la funcionalidad del receptor, niveles reducidos del ARNm y/o internalización del OTR (Phaneuf et al., 1997; Oakley et al., 2001). La desensibilización del OTR puede tener un papel importante si consideramos que para el manejo del dolor es necesario, en algunas ocasiones, que el tratamiento farmacológico sea recurrente.

La distribución y regulación de la expresión del OTR en el sistema nervioso central se ha estudiado en varias especies de roedores. En la rata, la mayor densidad de sitios de unión a OXT se detectó en el núcleo olfatorio anterior, la amígdala central y el subículo ventral. Menores niveles de unión se encontraron en el núcleo hipotalámico ventromedial (De Kloet et al., 1985), y en estructuras del sistema límbico, incluidas el núcleo accumbens, la corteza frontal prelímbica, el núcleo del lecho de la estría terminal, el septum lateral y la amígdala central y lateral (Insel y Shapiro, 1992). En humanos, se reportaron sitios de unión de OXT en el tronco encefálico y médula espinal, así como en el núcleo basal de Meynert, el núcleo de la rama vertical de la banda diagonal de Broca, la parte ventral del núcleo septal lateral, el área preóptica, el hipotálamo posterior, el globo pálido y el pálido ventral (Loup et al., 1989).

3. JUSTIFICACIÓN

Aun cuando se sabe que la administración espinal de OXT tiene efectos antinociceptivos en modelos de dolor evocado, así como efectos analgésicos cuando se administra epiduralmente en humanos, se desconoce si la administración recurrente de OXT sigue manteniendo el efecto antinociceptivo o analgésico. Más aún, se sabe que los efectos observados por la administración de OXT son por la activación de su receptor, sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción intracelular a través del cual la OXT lleva a cabo su acción antinociceptiva. Estudios previos demuestran consistentemente que la administración espinal de OXT tiene efectos sobre conductas nociceptivas evocadas (i.e. a través de estimulación térmica, química o táctil), pero se desconoce cuál es el efecto de este neuropéptido sobre conductas espontáneas resultantes de un proceso nociceptivo. Por lo tanto, establecer no solo si la OXT tiene efectos antinociceptivos recurrentes sino también sus efectos sobre conductas espontáneas, así como, determinar el mecanismo de acción, es relevante para dar una mejor descripción y entender como este neuropéptido ejerce su acción antinociceptiva misma que a futuro pueda transitar a su potencial uso (como analgésico) en humanos.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Se sabe que la OXT a nivel espinal tiene efectos antinociceptivos, pero aún se desconocen algunos aspectos relevantes en la acción de este neuropéptido, por lo que la presente tesis experimental fue diseñada para contestar las siguientes preguntas:

- ¿El tratamiento recurrente con OXT mantendrá los efectos antinociceptivos observados en administraciones agudas?
- ¿Cuál es el posible mecanismo de acción intracelular a nivel espinal de la OXT?
- ¿La administración espinal de OXT presentará efectos sobre las conductas espontáneas resultantes de un proceso nociceptivo?

5. HIPÓTESIS

A partir de las preguntas anteriores se formularon las siguientes hipótesis:

- La administración recurrente de OXT seguirá presentando su efecto antinociceptivo en cada administración.
- El mecanismo de acción en el efecto antinociceptivo de la OXT se deberá a una vía dependiente de la activación de proteínas de tipo Gq acopladas a su receptor.
- La administración espinal de OXT promoverá cambios sobre las conductas evocadas y espontáneas resultantes de un proceso nociceptivo.

6. OBJETIVOS

Para contestar las preguntas antes mencionadas y poner a prueba las hipótesis planteadas nos propusimos el siguiente objetivo general y los consecuentes objetivos específicos.

6.1 Objetivo general

Analizar el efecto antinociceptivo de la administración espinal de OXT sobre distintos modelos de dolor persistente, así como los principales mecanismos celulares involucrados.

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antinociceptivo en la administración recurrente de OXT a nivel espinal en un modelo de dolor neuropático.
- Determinar el posible mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de la OXT en la prueba de la formalina.
- Evaluar el efecto de la OXT sobre las conductas evocadas y espontáneas en un modelo de dolor postquirúrgico.

7. MÉTODOS

En el presente trabajo se emplearon tres procedimientos experimentales que inducen nocicepción y que reflejan algunas características del dolor persistente (cronicidad, Fig. 5). De forma breve, como modelos de dolor se usaron: 1) la ligadura de los nervios espinales (SNL, dolor neuropático), 2) la prueba de la formalina (dolor nociceptivo, inflamatorio y crónico) así como 3) el modelo de incisión plantar (dolor postquirúrgico). Estos modelos se eligieron para evaluar el efecto de la oxitocina en diferentes modalidades de dolor, considerando que cada modelo genera una respuesta nociceptiva particular. Ciertamente, el uso de una batería de modelos experimentales, para evaluar la acción de una molécula con potencial utilidad terapéutica, robustece la discusión y la conclusión de los hallazgos experimentales.

- 1) **Ligadura de los nervios espinales:** en este modelo la constricción de los nervios espinales L5 y L6 (ricas en fibras sensoriales del tipo A δ y C) promueve la generación de alodinia (percepción de dolor ante estímulos que antes resultaban inocuos) por la sensibilización central en neuronas de la medula espinal por el envío continuo de las señales nocivas por parte de fibras sensoriales dañadas. Las ventajas de esta prueba son 1) la lesión está estereotipada, y 2) las fibras aferentes se pueden distinguir entre lesionadas y no lesionadas, ya que la ligadura se realiza sobre los nervios espinales L5 y L6 distal al ganglio de la raíz dorsal (no se ven comprometidos los cuerpos de las neuronas), pero antes de la unión de los nervios en el plexo lumbar, evitando así daños o déficits motores por daños al nervio espinal L4. Sin embargo, este procedimiento quirúrgico resulta altamente invasivo y puede resultar en un proceso artificial o difícilmente observado en pacientes (Chung y Chung, 2007).
- 2) **Prueba de la formalina:** esta prueba es una de las técnicas más usadas para la medición de efectos analgésicos de diferentes fármacos, así como de sus mecanismos de acción. La ventaja de esta prueba es que permite analizar diferentes procesos de la generación del dolor como son: 1) la activación de las fibras aferentes primarias A δ y C (dolor nociceptivo; fase I), 2) la liberación de sustancias proinflamatorias por parte de las terminaciones nerviosas afectadas (dolor inflamatorio; fase II) y 3) la generación de sensibilidad a estímulos táctiles (fase III), resultado del continuo envío de señales nocivas por parte de las fibras A δ y C, así como de la participación de la microglía para favorecer un estado de sensibilización central que puede durar hasta 30 días. Este procedimiento resulta preferentemente de la activación de las fibras aferentes primarias, con una leve participación de las células musculares o epiteliales del sitio de administración (Tjølsen et al., 1992; Fu et al., 2001).

3) **Modelo de Incisión plantar:** este modelo es uno de los más cercanos a lo que podría ocurrir en la clínica después de un procedimiento quirúrgico en donde existe daño tisular y muscular. Este modelo, permite la evaluación de conductas nociceptivas evocadas y conductas espontáneas (movimientos posturales o de desplazamiento que permiten la interacción con el entorno) posteriores a un procedimiento quirúrgico. La intervención quirúrgica genera la liberación de sustancias proinflamatorias por parte de las células dañadas, que estimularán las fibras aferentes que a su vez enviarán la información nociva a la medula espinal. En la práctica, si este daño no es atendido de manera correcta puede derivar en la generación de dolor patológico (i.e. crónico) (Cowie y Stucky, 2019).

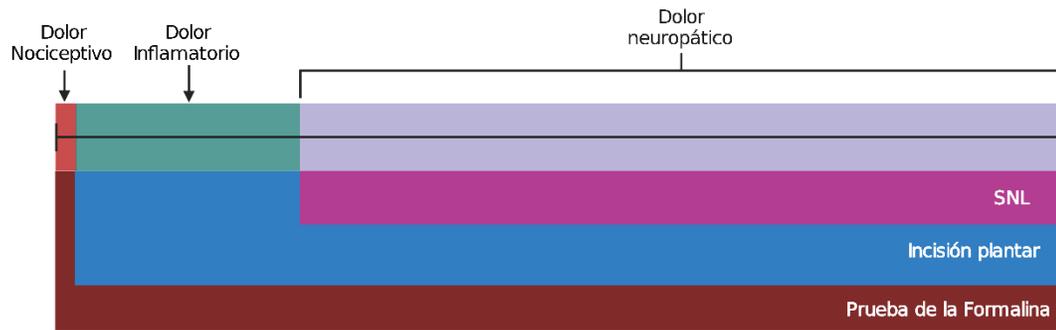


Figura 5: Modelos de dolor empleados en la tesis y las modalidades de dolor que abarcan.

7.1 Animales

Todos los experimentos se realizaron en ratas macho Wistar (180-220 g), las cuales tuvieron acceso libre a agua y alimentos. Los animales fueron facilitados por el bioterio del INB – UNAM Campus Juriquilla. Los experimentos se realizaron siguiendo los Lineamientos y Estándares para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983) y de acuerdo con las normas del INB.

Para los experimentos que a continuación se describen, se usó una n= 217, distribuidos de la siguiente manera:

- (i) Aproximación experimental 1, n= 43 animales.
- (ii) Aproximación experimental 2, n= 114 animales.
- (iii) Aproximación experimental 3, n= 48 animales.

7.2 Fármacos

Los fármacos usados en este estudio se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) o Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). De forma particular el: (i) acetato de oxitocina hidratada ($pK_i = 9.1$; IUPHAR/BPS: 2174; CAS: 50-56-6); (ii) 1- [6-(((17 β)-3-metoxiestra-1,3,5 [10]-trien-17-il) amino) hexil]-hidrato de 1H-pirrol-2,5-diona (U 73122; $K_d = 9 \times 10^{-6}$; IUPHAR/BPS: 5283; CAS: 112648-68-7); (iii) clorhidrato de éster metílico de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME; $pK_i = 6.82$; IUPHAR/BPS: 5213; CAS: 51298-62-5); (iv) 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ; $pK_i = 7.5$; IUPHAR/BPS: 5234; CAS: 41443-28-1); (v) 5-cloro-N-[4-(ciclohexilureidosulfonilfenetil)-2-metoxi-benzamida (gliburida o glibenclamida; $pK_i = 6.6$; IUPHAR/BPS: 2414; CAS: 10238-21-8).

La toxina *pertussis* de *Bordetella pertussis* (PTX; $K_d = 2.7 \times 10^{-5}$ (Lobban et al., 1991); CAS: 70323-44-3) fueron de Sigma Chemical Co. De Tocris Bioscience se usaron los siguientes fármacos: (i) (2S)-2-hidrocloruro de amino -N-[(1S,2S,4R)-7,7-dimetil-1-[[[4-(2-metilfenil)-1-piperazinil]-sulfonil]metil]-biciclo[2.2.1]hept-2-il]-4-(metilsulfonil)-butanamida (L-368,899; CAS: 160312-62-9); y el (ii) 3',4',5',6'-tetrahidroxispiro[isobenzofuran-1(3H),9'(9H)xanten]-3-ona (galeína; $K_d = 5 \times 10^{-7}$ (Lehmann et al., 2008); CAS: 2103-64-2).

La OXT y PTX se disolvieron en solución salina isotónica (NaCl al 0.9%). El L-NAME y la glibenclamida se disolvieron en la mínima cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, el ODQ se disolvió en DMSO al 10%, mientras que la galeína y el U-73122 se disolvieron en DMSO al 1%; las soluciones resultantes se aforaron con solución salina isotónica. Las dosis de los antagonistas y bloqueadores utilizados fueron seleccionados con base en estudios previos de farmacología conductual donde se demuestra que dichas dosis/concentraciones son suficientemente altas como para bloquear completa y selectivamente sus respectivos receptores (Williams et al., 1994; Hernandez et al., 1995; Narita et al., 2000; Mixcoatl-Zecuatl et al., 2006; Belkouch et al., 2011; White et al., 2014; Araldi et al., 2015)

7.3 Aproximación experimental 1: Efecto de la administración recurrente de OXT en un modelo de dolor neuropático.

Los experimentos que a continuación se describen se realizaron en una $n=43$ animales. Es importante mencionar que el diseño experimental de esta sección pretendió evaluar si la administración recurrente de OXT ejercía un efecto antinociceptivo en un modelo de dolor neuropático. Por este motivo se realizaron distintas evaluaciones sobre un mismo animal a lo largo de 22 días. La figura 6 muestra cómo fueron agrupados los animales, así como los tratamientos que recibieron. Es importante señalar que en esta primera aproximación experimental se realizaron 3 protocolos experimentales. El protocolo 1 se diseñó para estudiar el efecto de la estimulación eléctrica repetitiva del NPV sobre las respuestas nociceptivas generadas por un estímulo mecánico, por su parte el protocolo 2 se diseñó para analizar los efectos recurrentes de la administración intratecal (i.t.) o intraplantar (i.pl.) de OXT en tres pruebas somatosensoriales: von Frey, Hargreaves y Randall-Selitto. Mientras que el protocolo 3 se diseñó para medir las respuestas nociceptivas espinales en un ensayo electrofisiológico.

Es relevante mencionar que las concentraciones de OXT (1 nmol; i.t. y 31 nmol; i.pl.) usadas en esta sección experimental fueron elegidas considerando que ambas concentraciones han demostrado efectos antinociceptivos (Condés-Lara et al., 2005, 2006; Miranda-Cardenas et al., 2006; González-Hernández et al., 2017). Por otra parte, se evaluó el efecto de la OXT a nivel periférico, debido a la presencia del OTR en la piel (González-Hernández et al., 2017). Además de que con esto se puede llegar a definir si una administración periférica local de OXT podría presentar un efecto antinociceptivo mayor al de la administración espinal debido a la cercanía con la zona afectada.

7.3.1. Procedimientos generales

Para la inducción de nocicepción se usó un modelo de dolor neuropático desarrollado por Kim y Chung (Kim y Chung, 1992). Este modelo experimental es un modelo animal de mononeuropatía periférica generada por la ligadura de los nervios espinales (SNL). En este modelo las ratas son anestesiadas y colocadas en posición prona (boca abajo) donde se afeita la espalda baja. Se realiza una incisión en la zona lumbar de aproximadamente 2 cm a nivel de la cresta ilíaca posterior con la finalidad de acceder a los nervios espinales lumbares izquierdos. Los nervios espinales L₅ y L₆ se identifican y se separan cuidadosamente del músculo librando el nervio espinal L₄ adyacente y a continuación se ligan fuertemente distal al ganglio de la raíz dorsal usando una sutura de seda (Kim y Chung, 1992; Komori et al., 2007; Lin et al., 2007) (Fig. 7). Se debe evitar la ligadura del nervio espinal L₄ pues esta ligadura no produce un modelo de dolor relevante ya que este nervio contiene una gran cantidad de fibras motoras y la ligadura de dicho nervio provoca deficiencias motoras y por tanto interfiere con las pruebas de comportamiento.

En este modelo las alteraciones de comportamiento como la alodinia mecánica, alodinia fría, hiperalgesia térmica y dolor espontáneo se desarrollan dentro de las primeras 24 a 48 horas después de la intervención quirúrgica y persisten durante las 10 a 16 semanas posteriores a la cirugía (Kim y Chung, 1992; Choi et al., 1994; Kinnman y Levine, 1995; Moon et al., 1999; LaBuda y Little, 2005).

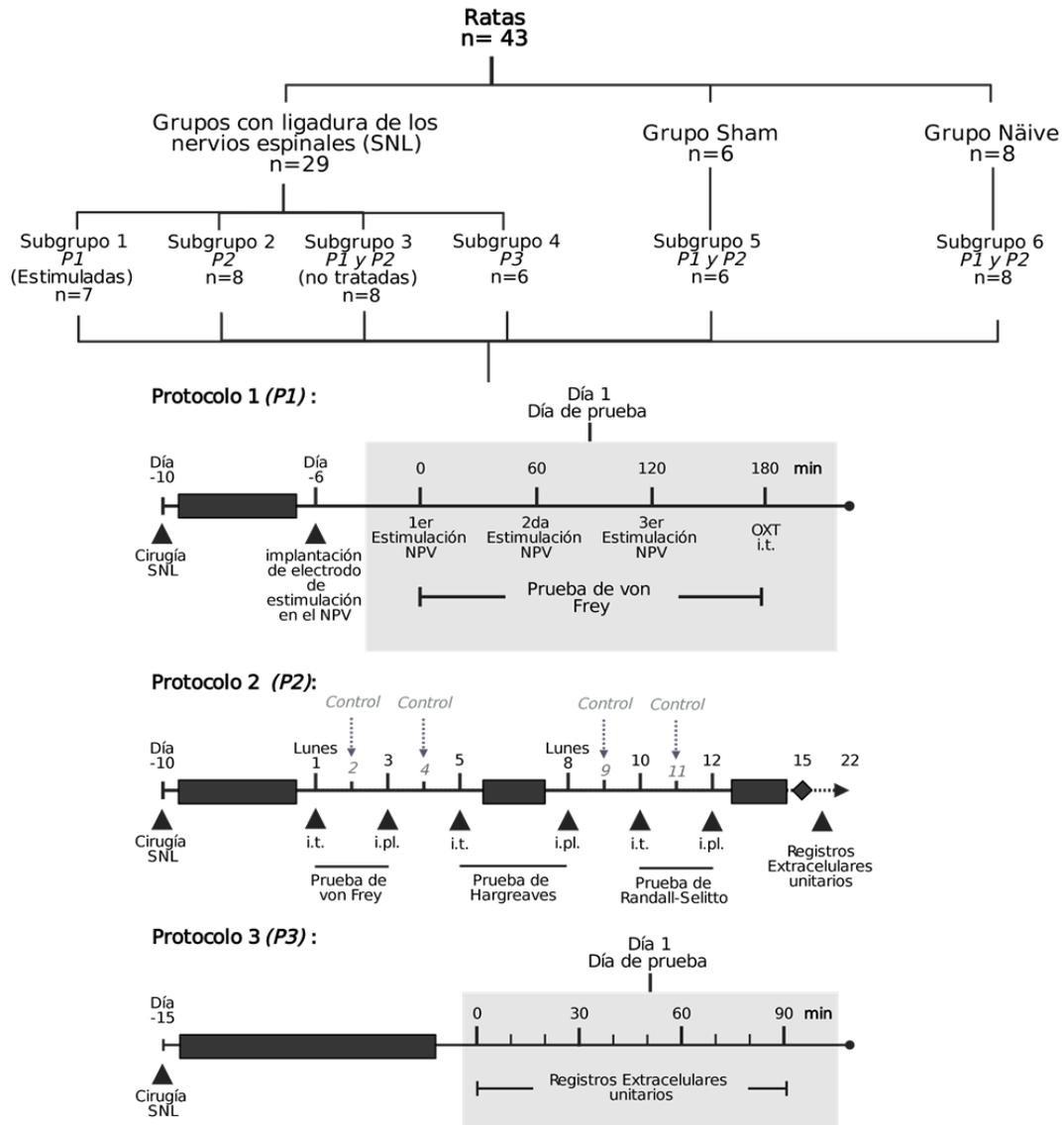
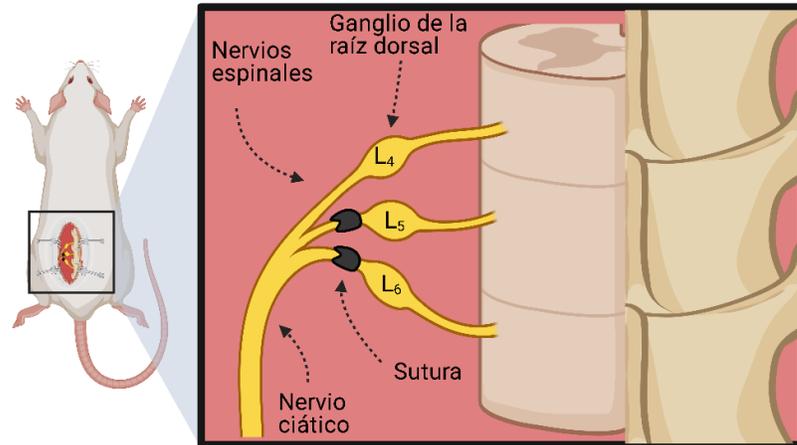


Figura 6. Grupos experimentales utilizados en la primera aproximación experimental. Los animales se dividieron en tres conjuntos principales (SNL, Sham y Nüive). Los animales SNL se compararon con los grupos simulados y sin tratamiento previo. Los protocolos 1, 2 y 3 (*P1*, *P2* y *P3*) muestran en una escala temporal. Para *P1* y *P2*, la cirugía SNL se realizó a los 10 días antes de la respectiva prueba conductual. En el *P1*, la SNL se realizó a los 10 días y la implantación del electrodo en el NPV se realizó a los 6 días antes de la prueba de von Frey; en el caso del *P2*, los experimentos electrofisiológicos se realizaron después de que se completaron los experimentos conductuales (25 días después de la cirugía de SNL). Además, en el caso de *P3*, se realizaron experimentos electrofisiológicos 15 días después de la cirugía de SNL. Ligadura de nervios espinales SNL, núcleo paraventricular del hipotálamo NPV, i.t. intratecal, i.pl. intraplantar



Médula espinal (zona lumbar)

Figura 7. Ligadura de nervios espinales (SNL). Diagrama que muestra la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, en el modelo de dolor neuropático propuesto por Kim y Chung. Modificado de Jaggi et al., 2011.

En algunos animales se realizó una pequeña craneotomía para colocar un electrodo de estimulación concéntrico de acero inoxidable (1 M Ω) en el NPV [7.0 mm AP interaural, 0.2 mm lateral y 2 mm de altura; (Paxinos y Watson, 2007)]. Brevemente, se anestesiaron ratas SNL con una mezcla de ketamina/xilazina (45/12 mg/kg; intraperitoneal, i.p.) y se colocaron en un marco estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA). Posteriormente se realizó un trépano para la implantación de los electrodos de estimulación (microalambre de acero inoxidable aislado en teflón, \varnothing 279 μ m, núm. de cat. 7920; AM Systems, Inc. Carlsberg, EUA) en las coordenadas antes mencionadas.

Por otra parte, para la administración intratecal de fármacos se usó el método desarrollado por Mestre et al. (1994). De forma breve, para la administración por este método, el animal fue anestesiado con una mezcla de gases de sevoflorano (5 %) con N₂O y O₂ a través de una máscara nasal. Cuando la rata está completamente anestesiada, se inserta una aguja de calibre 25G sobre el tejido localizado que cubre los espacios intervertebrales dorsales que se ubican entre las vértebras lumbares L₅ y L₆ en un pequeño orificio localizado entre ambas vértebras (Fig. 8). Este sitio se selecciona de modo que la inyección se limite a la región donde termina la médula espinal y comienza la “cola de caballo”, con el fin de reducir la posibilidad de provocar un daño sobre la médula y aumentar así la accesibilidad al espacio intervertebral.

Cuando la aguja entra al espacio subaracnoideo se observa un movimiento brusco y repentino de la cola. Este reflejo es usado como un indicador de que la punción se llevó a cabo con éxito. Además de esto no se observa ningún otro comportamiento específico como signo de sufrimiento o dolor. Por otra parte, una vez que la aguja se encuentra en posición se inyecta un volumen constante de 20 μ l. Entonces la jeringa se mantiene en posición por unos pocos segundos y se retira progresivamente (Mestre et al., 1994).

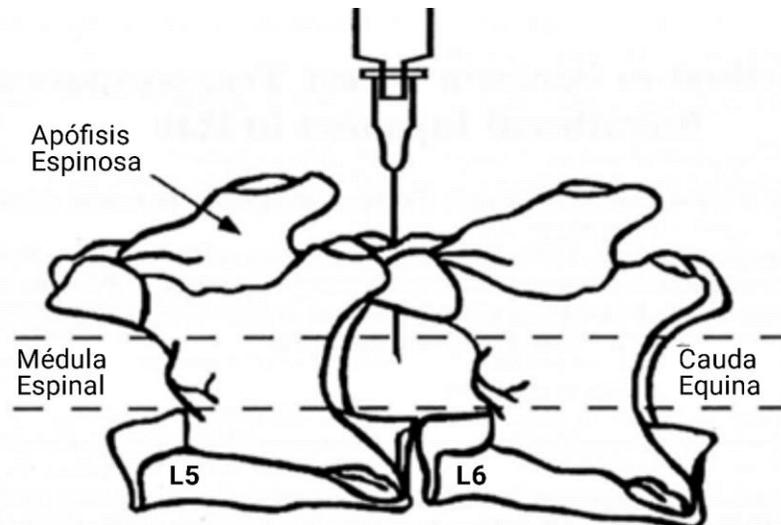


Figura 8. Inyección intratecal (método de Mestre). Diagrama que muestra la inserción de la aguja en el espacio intervertebral, entre L₅ y L₆. Modificado de Mestre et al., 1994.

7.3.2. Pruebas conductuales

7.3.2.1. Procedimiento para evaluar alodinia táctil

Una respuesta nocifensiva exagerada a los estímulos mecánicos se considera un indicador clave del procesamiento sensorial anormal en la mayoría de los modelos animales de dolor neuropático (Mogil, 2009; Ruscheweyh et al., 2011). La sensibilidad a estímulos mecánicos se puede determinar por medio de la cantidad de fuerza requerida para provocar un cambio en el comportamiento del animal. Ejemplo de esto es el retiro de la pata que es provocado al ser aplicados diferentes estímulos táctiles como los generados por los filamentos de von Frey (Chaplan et al., 1994). Existen diferentes métodos disponibles para calcular el umbral de retiro de la pata, pero el método *Up-Down* de Chaplan y Dixon (Dixon, 1965, 1980; Chaplan et al., 1994), aplicado a roedores continúa siendo de los más utilizados.

En este modelo todas las pruebas de comportamiento se realizan sobre grupos independientes de ratas. La hipersensibilidad mecánica se puede cuantificar mediante la determinación de los umbrales de retiro de la pata, como respuesta a una estimulación mecánica como la generada por los filamentos de von Frey cuando son aplicados sobre el área de la piel de la superficie plantar de la extremidad posterior (Chaplan et al., 1994).

Por otra parte, se debe evitar la estimulación de los dedos, almohadillas o talón de dicha extremidad, para no provocar una respuesta falso-positivo generada por la activación de fibras A β que son fibras extremadamente sensibles (Leem et al., 1993), ya que, lo que se busca es la activación de las fibras A δ y C mejor conocidas como fibras nociceptoras que son las encargadas de la transmisión de la señal nociceptiva (Leem et al., 1993).

Para llevar a cabo este modelo las ratas son colocadas dentro de cajas de acrílico (cámaras de observación) que se encuentran encima de un soporte metálico cuyo piso es de malla de alambre lo que permite el acceso completo a las patas del animal. Después de la aclimatación (30 minutos antes de realizar los ensayos). Los umbrales de retiro de la pata se miden usando el método *Up-Down* (Dixon, 1965, 1980; Chaplan et al., 1994), esto es mediante el incremento de presión y fuerza ejercida (la fuerza y presión van desde 1.4 hasta los 15 gramos) generada por los filamentos de von Frey en la zona de la extremidad ensayada. La presión debe ser constante durante aproximadamente 3 segundos con un intervalo de 1 minuto aproximadamente entre estímulo y estímulo. El estímulo de 2 gramos de presión se aplica primero en cada ocasión.

Cada vez que se produce una respuesta de retirada con un filamento dado se aplica el filamento inmediatamente más pequeño. Por el contrario, cuando se produce una respuesta negativa se aplica el filamento inmediatamente superior (Fig. 9). La prueba continúa hasta que:

1. Se hayan producido respuestas a 6 estímulos idénticos después del primer cambio en la respuesta
2. Se dé una respuesta negativa al filamento de von Frey más alto o una respuesta positiva al filamento de von Frey más pequeño.
3. Una retirada abrupta de la pata, lamido de la extremidad y estremecimiento general se consideran como respuestas positivas.

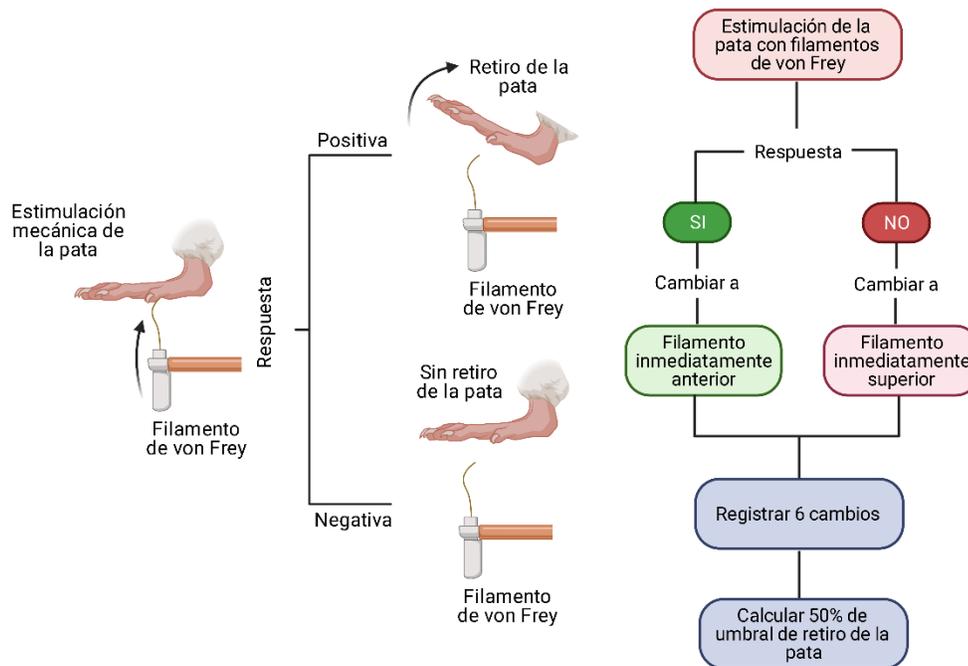


Figura 9. Método para determinar el umbral de retiro de la pata (Chaplan y col. en 1994).

Para determinar si existe el desarrollo de alodinia en los animales ensayados el umbral de retiro de la pata debe mantenerse por debajo de los 4 g ya que bajo este umbral se activan las fibras nociceptoras A δ y C (Leem et al., 1993).

El método de Dixon (1980) dentro del modelo *Up-Down* se utiliza para determinar el 50% de umbral de retiro de la pata, para ello se emplea una serie de filamentos, comenzando con el que genera una presión de 2g, estos filamentos son colocados en la planta de la pata de la rata de manera consecutiva. El levantamiento o retiro de la pata se considera una respuesta positiva, mientras que una inactividad o falta de respuesta se considera negativa, con lo cual se procede al empleo de un filamento de peso menor o mayor, respectivamente. En caso de que se generen cuatro o cinco respuestas negativas consecutivas será asignado un valor de 15 g o, por el contrario, si se dan cuatro respuestas positivas consecutivas se asignará un valor de 0.25 g. De acuerdo con Dixon (1980) el cálculo del umbral del 50% de retiro de la pata óptimo requiere de 6 cambios próximos en las respuestas de retiro después del cambio inicial.

Los valores asignados a los resultados obtenidos se dieron de acuerdo con la fórmula:

$$50\% \text{ umbral} = \frac{10^{(Xf + \kappa\delta)}}{10000}$$

Donde Xf es el valor (en unidades logarítmicas) del último filamento de Von Frey usado, κ es el valor obtenido a partir de las tablas de Dixon (1980) para calificar el patrón de respuestas positivas y/o negativas y δ es la media de las diferencias entre los puntos fuertes de un estímulo (en unidades logarítmicas). Se considerada que la alodinia está presente cuando el umbral de retiro está por debajo de los 4g.

Bajo estas condiciones experimentales y usando el protocolo 1 para el primer subgrupo de ratas (Fig. 6), probamos el efecto de estímulos eléctricos repetidos en el NPV (administrados a intervalos de 60 minutos) y una administración i.t. de OXT sobre el comportamiento nocifensivo evocado. Se midió en un curso temporal (0-240 min) la acción antinociceptiva inducida por estímulos eléctricos en el NPV dados inmediatamente después de la medición basal, tiempo 0 y a los 60 y 120 min. Además, se administró OXT de manera i.t. (180 min). El NPV se estimuló eléctricamente durante 6 segundos (60 Hz, 1 mseg de duración del pulso, 300 μ A) usando un estimulador de Grass (Mod. S11A) conectado a la unidad de aislamiento (Mod. PSIU6). Estos parámetros inducen efectos antinociceptivos específicos (Condés-Lara et al., 2006), además ninguno de los animales estimulados presentó comportamientos de alerta, congelamiento, escape o convulsión durante la estimulación.

En el segundo subgrupo de SNL (protocolo 2), la prueba del umbral de retiro con los filamentos de Von Frey se realizó en el nivel basal (B) (inmediatamente antes de la administración i.pl. de 31 nmol o 1 nmol de OXT) y a los 5, 15, 30, 45, 60, 80, 100 y 120 min después de la administración de OXT. En los días siguientes, este subgrupo fue sometido a las pruebas de Hargreaves y Randall-Selitto.

En ambos casos (1º y 2º subgrupo), los resultados obtenidos se compararon con el grupo SNL no tratado (3º subgrupo), ratas Sham (5º subgrupo) y ratas sin tratamiento previo (Näive) (6º subgrupo).

7.3.2.2. Procedimiento para evaluar hiperalgesia térmica

Se evaluó la hiperalgesia térmica (Dirig et al., 1997) usando la prueba de Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Brevemente, las ratas se colocaron en cajas transparentes individuales con piso de vidrio que permitieron aplicar un estímulo térmico mediante un generador de infrarrojos sobre la piel glabra del pie (Aparato de Hargreaves, Cat. No. 37370; Ugo Basile). Todos los animales se aclimataron en la caja durante 30 minutos antes de la prueba. El dispositivo arroja la latencia de la respuesta de retirada (tiempo para la retirada brusca de la pata); se estableció un límite de 20 segundos para evitar daño tisular. La prueba se repitió dos veces y se calculó la latencia media de retirada de la pata. Se determinaron las respuestas de retirada de la pata izquierda (ipsilateral a la ligadura) después de (10 min), OXT i.t. (1 nmol; día 5) u OXT i.pl. (31 nmol, ipsilateral a la ligadura; día 8). El efecto de OXT se comparó con los subgrupos SNL sin tratamiento, NÄIVE y Sham.

7.3.2.3. Procedimiento para evaluar hiperalgesia mecánica

La hiperalgesia estática medida como umbral nociceptivo mecánico (Randall y Selitto, 1957) se cuantificó usando un medidor de analgesia de presión de pata Ugo Basile (nº de cat. 57215; Stoelting), que aplica una fuerza en constante aumento al dorso de la pata trasera de una rata. Se utilizó tejido de algodón para inmovilizar a los animales para medir el umbral, definido como la fuerza a la que el animal retira su pata. La prueba se repitió dos veces y se calculó el promedio. Las respuestas de retirada de la pata izquierda (ipsilateral a la ligadura) se determinaron después de la ligadura de los nervios (10 min), o de la administración de OXT i.t. (1 nmol; día 10) u OXT i.pl. (31 nmol, ipsilateral a la ligadura; día 12). El efecto de OXT se comparó con las ratas SNL no tratadas, sin tratamiento previo y simuladas.

7.3.3. Registros electrofisiológicos *in vivo*

Para los experimentos electrofisiológicos *in vivo*, se utilizaron los subgrupos 2º, 3º, 4º y 5º. En el caso de los subgrupos SNL 2º y 3º, estos animales se utilizaron al final de los experimentos de comportamiento descritos anteriormente (> 25 días posteriores a la cirugía; Fig. 6). Es importante destacar que, en el caso del 4º subgrupo, los experimentos electrofisiológicos se realizaron en los días 15 a 17 del postoperatorio (cirugía SNL).

7.3.3.1. Procedimiento quirúrgico (laminectomía)

Los animales se introdujeron en una cámara y se anestesiaron con sevoflurano al 5% (en una mezcla de $\frac{3}{4}$ N₂O y $\frac{1}{4}$ O₂) administrado a través de un vaporizador. En estas condiciones, se insertó una cánula intratraqueal para ventilación artificial (60 ciclos/min) y para mantener la anestesia. El volumen sistólico se ajustó mecánicamente para mantener un equilibrio ácido-base normal durante todo el experimento. Luego, las ratas se montaron en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, EUA) con un marco de restricción para la médula espinal. Para registrar la actividad neuronal unitaria evocada de las células espinales WDR, se realizó una laminectomía (segmentos L₂-L₄) para exponer la médula espinal. El CO₂ expirado final se midió con un analizador de CO₂ Capstar-100 (CWI Inc., Ardmore, EUA) y se mantuvo entre 2.5 y 3.2%. La temperatura corporal central se mantuvo a 38 ° C usando una almohadilla de agua circulante. Además, se realizó una pequeña craneotomía para colocar un electrodo de estimulación concéntrico de acero inoxidable en el PVN (como se describió anteriormente). Los protocolos experimentales posteriores se realizaron con sevoflurano al 2.5%.

7.3.3.2. Registros extracelulares unitarios de neuronas de amplio rango dinámico (WDR)

Se utilizaron microelectrodos de vidrio o cuarzo-Pt-W (4–10 MΩ) montados en un sistema Eckhorn microdrive (Thomas Recording GmbH, Giessen, Alemania) para registrar la actividad unitaria extracelular. Los microelectrodos de vidrio se llenan con pontamina¹ al 2% (KCl 1M) y se bajan hasta las láminas superficiales de los segmentos del asta dorsal espinal izquierda (~200 -1500µm desde la superficie) para obtener descargas unitarias. El campo receptivo periférico específico (RF) se localiza dando golpecitos en la pata trasera ipsilateral; posterior a esto, la estimulación eléctrica se aplica mediante dos electrodos insertados en el campo receptivo. Por último, la actividad neuronal se registra, amplifica, digitaliza y discrimina mediante una interfaz CED 1401 acoplada al software Spike2 V5.15 (Cambridge Electronic Design, Reino Unido).

¹ La pontamina es una sustancia fluorescente utilizada en histología para marcar la localización de las neuronas WDR en el asta dorsal espinal, cuando es cargada en los microelectrodos de registro.

7.3.3.3. Estimulación mecánica o eléctrica del campo receptivo

Se insertaron subcutáneamente en el campo receptivo (RF) de la neurona registrada dos agujas finas (27 G) unidas a una unidad aislante de estímulo (Mod. PSIU6, Grass Instruments Co., Warwick, USA). Posteriormente, se realizó una prueba de estimulación eléctrica; esta prueba consistió en 20 estímulos a 0.5 Hz (Estimulador Mod. S88, Grass Instruments Co., Warwick, USA.), con una duración de pulso de 1 mseg a 1.5 veces el umbral de intensidad requerida (0.1-3 mA) para evocar una respuesta de las fibras C. En estas condiciones, se registraron las respuestas electrofisiológicas de las neuronas WDR en la situación basal. En el caso del protocolo 2 (P2). Se evaluó el efecto de la administración tópica espinal de OXT (1 nmol/10 μ l) sobre las respuestas neuronales nociceptivas evocadas en un tiempo (t) = 5, 10 y 20 min. En el caso del protocolo 3 (P3), después de medir la respuesta de las neuronas WDR en la situación basal, se midieron las respuestas neuronales inducidas por los filamentos de von Frey (2, 4, 10 y 15 g). Inmediatamente después, las respuestas WDR neuronales inducidas por la estimulación eléctrica del campo receptivo se evaluó antes y después de la estimulación eléctrica del NPV. El NPV fue estimulado eléctricamente durante 6 s a 60 Hz con una duración de pulso de 1 ms y 300 μ A. En esta condición, construimos histogramas de tiempo peri-estímulo (PSTH) y *raster plots* para medir las respuestas WDR neuronales antes y después de la estimulación del NPV. Además, cuando la actividad neuronal vuelve a la basal, se analizó el efecto de la administración tópica espinal de OXT (1 nmol / 10 μ l) en las respuestas evocadas nociceptivas neuronales en un tiempo (t) = 5, 10 y 20 min.

7.3.3 Análisis de datos

En todos los casos, se verificó que el conjunto de datos siguiera una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y la potencia de la prueba realizada (α se estableció en 0,8 como mínimo). En todos los casos, para excluir valores atípicos en algún grupo de muestra, se realizó la prueba de Grubb. En los experimentos que utilizaron el umbral de retirada de von Frey, se construyeron curvas con la media \pm error estándar de la media (EEM) que representa el 50% del umbral de retirada en función del tiempo. Sin embargo, dado que el umbral calculado no produjo un continuo matemático (es decir, datos no paramétricos), realizamos un análisis de varianza de medidas repetidas de Friedman (ANOVA MR) en rangos para analizar la estabilidad intragrupo de las medidas a lo largo del tiempo. Además, para analizar el efecto de los diferentes tratamientos en las mediciones con los filamentos de von Frey, los datos se normalizaron calculando el área bajo la curva (ABC) del 50% del umbral de retiro contra el tiempo, para posteriormente aplicar un ANOVA de una vía. El ABC, que es una expresión de la duración y la intensidad del efecto, se calculó mediante la regla de los trapezoides.

Los datos obtenidos de las pruebas de Hargreaves y Randall-Selitto se representaron mediante diagramas de caja y bigotes que se analizaron con un ANOVA de una vía.

Para los experimentos electrofisiológicos, el número de potenciales evocados inducidos por estimulación eléctrica se normalizó y se expresó como cambio porcentual desde la línea de base. Esta respuesta inicial se estableció después de que una neurona identificada tuviera una variación $\leq 10\%$ en las respuestas neuronales inducidas por la estimulación del campo receptivo durante tres pruebas consecutivas (5 min entre cada prueba). Para comparar los valores de las respuestas de las fibras neuronales A β , A δ o C antes (respuesta basal) y después de la administración espinal de OXT, posteriormente se realizó un ANOVA de MR bidireccional. Los ANOVA unidireccionales y bidireccionales fueron seguidos, si corresponde, por la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se aceptó la significancia estadística en $p < 0.05$.

7.4 Aproximación experimental 2: Evaluación del posible mecanismo de acción de la administración espinal de OXT en el modelo de la formalina.

En estos experimentos se usó una $n=114$ de animales, los cuales fueron divididos en 2 subgrupos (Fig. 10) con el fin de analizar: (i) el efecto de la administración de OXT o la estimulación del NPV sobre las respuestas nociceptivas inducidas por la administración s.c. de formalina ($n=30$), comparado con un control positivo como el diclofenaco ($n=6$) y (ii) el posible mecanismo de acción tras el efecto antinociceptivo de la administración espinal de OXT ($n= 84$). Para esta serie de experimentos, se consideró también el posible efecto antinociceptivo a largo plazo de la OXT, por lo que se evaluó la conducta nociceptiva en dos tiempos distintos, uno inmediatamente después de la administración de formalina (efecto temprano) y el otro del día 3 al 30 posteriores a la administración de formalina (efecto tardío).

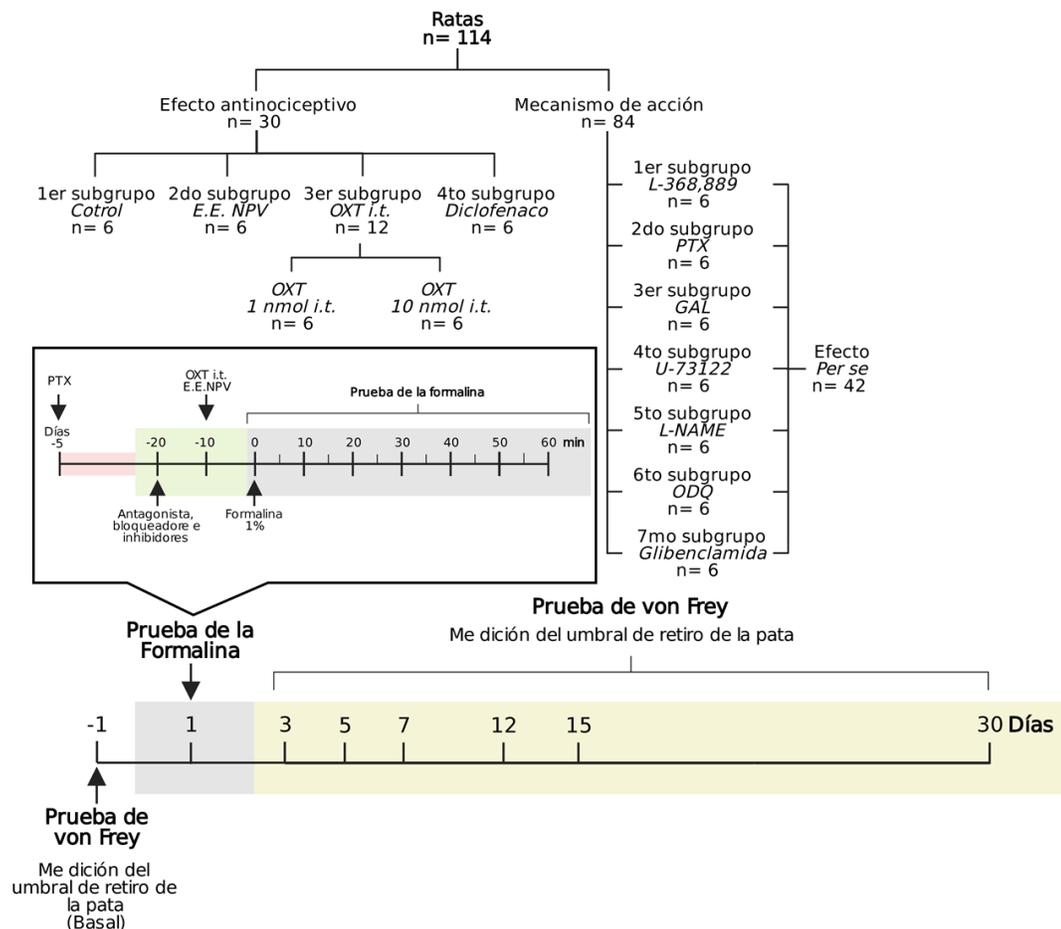


Figura 10. Grupos experimentales utilizados en la segunda aproximación experimental. Los animales se dividieron en dos conjuntos principales (efecto antinociceptivo y mecanismo de acción). Los animales tratados con OXT o estimulación eléctrica del NPV se compararon con el grupo control (únicamente administrado con formalina al 1%) mientras que los animales tratados con el antagonista, los bloqueadores e inhibidores se compararon contra el grupo control, así como contra el grupo OXT 10 (nmol i.t.).

Figura 10 (continuación) Para ambos conjuntos se muestran unas escalas temporales. Una que ejemplifica cuando se administraron los tratamientos y como se realiza la prueba de la formalina y otra donde se muestra todo el tiempo que duró el experimento (30 días), así como los días que se hizo la medición del umbral de retiro de la pata.

7.4.1 Procedimiento general

La nocicepción se puede evaluar mediante la administración de agentes químicos, los cuales producen una respuesta inflamatoria (Winter et al., 1962; Wheeler-Aceto y Cowan, 1991); una de estas pruebas es la de la formalina propuesta por Dubuisson y Dennis (1977) y detallada por Wheeler-Aceto y Cowan (1991). Para esta prueba, las ratas se colocan en cámaras de observación durante 30 min para permitir la adaptación a su entorno, varios espejos se colocan en cada cámara para permitir la libre observación del animal. Después de este tiempo, a las ratas se les administra 50 µl de formalina al 1% en el dorso de la pata trasera con una aguja de calibre 30G. Inmediatamente después, los animales son devueltos a las cámaras y se observa el comportamiento nociceptivo, el cual consta de una sacudida violenta de la pata administrada. Este comportamiento nociceptivo se puede cuantificar como el número de retiros de la pata durante períodos de 1 min cada 5 min, hasta 60 min después de la inyección de formalina (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991). El retiro de la pata inducido por la administración de la formalina genera una curva bifásica. La fase inicial (0-10 min, Fase I) se debe a la activación de fibras aferentes primarias, seguida por un período de reposo relativamente corto. Posteriormente se desencadena una respuesta tónica prolongada (15-60 min, Fase II) (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991).

Por otra parte, esta prueba también ha demostrado una tercera fase asociada a una sensibilización de la zona administrada (Fu et al., 2001). Experimentalmente en esta fase hay un incremento en la sensibilidad ante estímulos táctiles, (i.e., disminución del umbral de retiro de la pata medida con los filamentos de von Frey), asociado a comportamientos de tipo alodinia e hiperalgesia (Salinas-Abarca et al., 2017).

7.4.2 Diseño experimental

Los experimentos descritos en esta sección fueron diseñados para caracterizar el potencial efecto antinociceptivo de la OXT (1 o 10 nmol, i.t.) o la estimulación eléctrica del NPV en la prueba de la formalina. Dicha prueba se realizó bajo los parámetros descritos por Wheeler-Aceto y Cowan (1991). De forma breve, las ratas se colocaron en cámaras de observación durante 30 min para permitir la adaptación a su entorno; después de este periodo, a las ratas se les administró s.c. 50 µl de formalina al 1% en el dorso de la pata trasera. El comportamiento nociceptivo inmediato se cuantificó como el número de sacudidas de la pata observados tras la administración de formalina, durante períodos de 1 min cada 5 min, hasta 60 min (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991).

Considerando que la formalina induce nocicepción de forma tardía (>3 días), se evaluó el comportamiento nociceptivo tardío con filamentos de von Frey los días 3, 5, 7, 12, 15 y 30 después de la inyección de formalina.

La administración i.t. de OXT o su vehículo fue realizada a través de la técnica de Mestre et al. (1994). La OXT, la estimulación eléctrica del NPV o el diclofenaco fueron dados 10 min previos a la formalina. El posible mecanismo de acción del efecto antinociceptivo inducido por la OXT se evaluó a través del:

1. Bloqueo selectivo de su receptor (OTR).
2. La inactivación de la fosfolipasa C (PLC, vía dependiente de la activación de las proteínas del tipo G_q), las proteínas G_i o de las subunidades $G_{\beta\gamma}$.
3. La inhibición de la vía NO/GMPc/canales de K_{ATP} que pueden ser activadas por este receptor.

Para ello se utilizaron:

1. El antagonista del OTR, el L-368,899 (10 nmol, i.t.) (Williams et al., 1994).
2. Para discriminar la probable proteína G involucrada se usó:
 - a. El U-73122 (4 nmol; Inhibidor de la fosfolipasa C, activada por las proteínas G_q) (Narita et al., 2000).
 - b. La toxina *Pertussis* (1 μ g); inactivador de la subunidad G_α de las proteínas G_i) (Hernandez et al., 1995).
 - c. la galeina (137 nmol; inhibidor de la subunidad $G_{\beta\gamma}$) (White et al., 2014; Li et al., 2015).
3. Para determinar la participación de la NO/GMPc/canales de K_{ATP} se usó:
 - a. El inhibidor de la sintasa del óxido nítrico neuronal, L-NAME (370 nmol, i.t.) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004).
 - b. El inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ (50 nmol, i.t.) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004).
 - c. El bloqueador de canales K_{ATP} , la glibenclamida (100 nmol, i.t.) (Mixcoatl-Zecuatl et al., 2004).

Estos fármacos se administraron 10 minutos antes que la OXT. La formalina se administró 10 min después de la OXT, y la conducta nociceptiva temprana y tardía inducida por la formalina fue evaluada.

7.4.3 Análisis de datos

En los experimentos donde se contaron el número de sacudidas de la pata (Fases I y II de la prueba de la formalina), los resultados experimentales se presentan como cursos temporales o ABC, donde se indica el error estándar de la media, en este caso a menor valor del ABC mayor efecto antinociceptivo. Mientras que, para la fase tardía de la prueba de la formalina, los resultados se presentan como curvas o ABC que representa el 50% del umbral de retirada en función del tiempo, estas curvas se construyeron con la media \pm error estándar de la media, donde a mayor valor de ABC mayor efecto antinociceptivo. Los datos fueron analizados usando análisis de varianza (ANOVA). Los ANOVA fueron seguidos por la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Se aceptó la significancia estadística en $p < 0.05$.

7.5 Aproximación experimental 3: Efecto de la administración de OXT en conductas espontáneas en un modelo de dolor postquirúrgico.

En un grupo de animales (n= 48) se analizó el posible efecto antinociceptivo preventivo del pretratamiento i.t. de OXT antes de un procedimiento quirúrgico en un modelo de dolor postquirúrgico (modelo de incisión plantar). Para esto, los animales fueron separados en dos grupos (cada uno con una n=24; Fig. 11), donde se analizó el efecto de la OXT sobre: (i) sobre la nocicepción evocada por filamentos de von Frey; y (ii) sobre el comportamiento espontáneo (como modelo sustituto de dolor espontáneo).

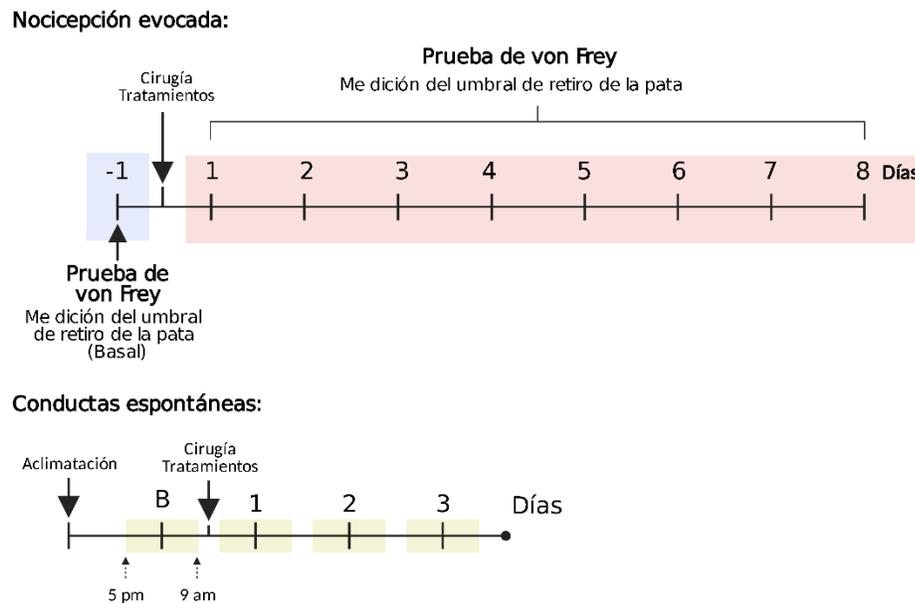


Figura 11. Grupos experimentales utilizados en la tercera aproximación experimental. Los animales se dividieron en dos conjuntos principales (Nocicepción evocada y conductas espontáneas). Se muestran dos líneas temporales donde se indica el tiempo que duran los experimentos (nocicepción evocada y conductas espontáneas). En ambas series de experimentos. Los animales con cirugía y tratados con OXT (10 nmol) o vehículo se compararon con el grupo control.

7.5.1 Incisión plantar como un modelo de dolor postquirúrgico

Este modelo de dolor, se asemeja a lo que ocurriría después de una intervención quirúrgica (Brennan, 2011). Para este modelo se anestesia con isoflurano al 4-5% administrada a través de un cono nasal (Brennan et al., 1996). Bajo estas condiciones experimentales se realiza una incisión longitudinal de 1 cm a través de la piel, la fascia y el músculo de la planta de la pata del animal. La incisión se realiza a 12 mm distal desde el borde del talón (Fig. 12). Este procedimiento genera una inflamación de la zona, con la subsecuente aparición de sensibilidad en la zona dañada, la cual puede ser estimulada con los filamentos de von Frey y generar una respuesta de retiro (Brennan et al., 1996), o se pueden analizar conductas espontáneas (Gould, 2009).

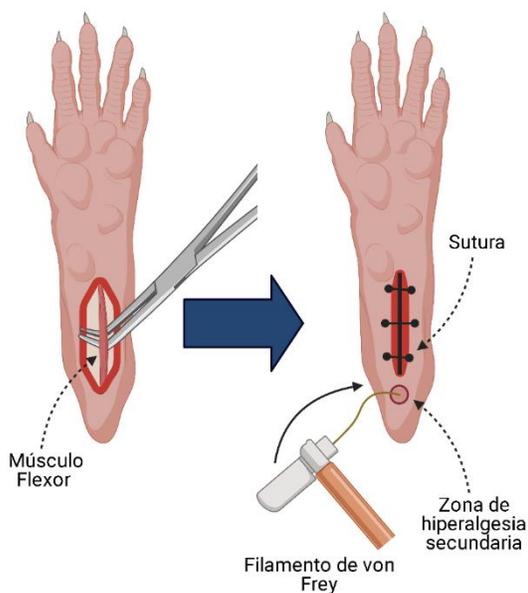


Figura 12. Modelo de incisión plantar. desarrollado por Brennan et al., 1996. Modificado de Espinosa De Los Monteros-Zúñiga et al., 2020.

7.5.1.1. Respuestas de retiro inducidas por filamentos de von Frey

El análisis conductual para establecer la magnitud de la hiperalgesia mecánica después de la incisión plantar se realizó con los filamentos de von Frey (Brennan et al., 1996; Pogatzki et al., 2002). Para esto, las ratas se colocan individualmente en cámaras de observación colocadas sobre un piso de malla elevado, donde se les permite aclimatarse durante 30 min.

Una vez pasado este tiempo, se evalúa la conducta de retiro de la pata aplicando los filamentos de von Frey en un área adyacente a la incisión realizada. Cada filamento de von Frey (15, 30, 42, 65, 73, 98, 149 y 265 mN) se aplica una vez, comenzando con 15 mN hasta producir una respuesta de retirada (Brennan et al., 1996; Pogatzki et al., 2002). El promedio de tres pruebas que produjeron una respuesta de retirada se considera el umbral de retiro de la pata. Si no existe un comportamiento de retirada, se registran 522 mN (Brennan et al., 1996).

7.5.1.2. Evaluación de la actividad espontánea

El efecto de la administración de fármacos sobre la nocicepción en modelos de dolor se puede analizar evaluando conductas espontáneas a través de un equipo de campo abierto (Gould, 2009). El equipo que usamos en los presentes experimentos consta de sensores que emiten un haz de luz infrarroja que se utiliza para determinar la ubicación de cada animal en todo momento. Con este equipo se pueden monitorear diferentes conductas como pueden ser: distancia total recorrida (que es la distancia en centímetros que recorre el animal durante el lapso de la prueba), actividad vertical (que son las ocasiones en las que el animal se para en sus patas traseras) (Gould, 2009).

Considerando que se pueden evaluar estas variables, se han propuesto a este método como un punto importante para analizar indirectamente compuestos que tengan potenciales efectos antinociceptivos (Imanaka et al., 2008; Tatem et al., 2014; Majuta et al., 2017b, 2017a).

7.5.2. Diseño Experimental

Debido a que la OXT mostró tener un efecto preventivo en la generación de sensibilidad posterior a un estímulo nocivo (ver sección 8.2.1) se analizó este efecto en un modelo de dolor postquirúrgico, evaluando las conductas evocadas y espontáneas. Para las conductas evocadas, se utilizaron los filamentos de von Frey para medir la magnitud de la hipersensibilidad mecánica inducida por la incisión plantar. Todas las ratas fueron analizadas previamente a la cirugía (1 día antes), para estimar el umbral mecánico basal. Posterior a la incisión plantar, se analizó el umbral mecánico entre los días 1 a 8 después de la cirugía (Brennan et al., 1996).

Brevemente, se evaluó el umbral de retiro primario a la estimulación puntiforme generada por la aplicación de los filamentos de von Frey (Touch-Test™ Sensory Evaluators, North Coast Medical, Inc., USA). Esta estimulación con los filamentos se realiza en un área adyacente a la incisión (cerca del talón). Cada filamento de von Frey (14, 20, 39, 59, 78, 98, 147, 255 y 588 mN) se aplicó una vez, comenzando con el que genera una fuerza de 14 mN, de no haber una respuesta de retirada se procedía con el filamento inmediatamente posterior y se continuaba así hasta que se producía una respuesta de retirada. Si no había retirada de la pata, se registraban 588 mN. El umbral de retiro se calculó a partir del promedio de tres pruebas.

En el caso de las conductas espontáneas, se evaluó el comportamiento de las ratas los días 0 (basal), 1 (el mismo día de la cirugía), 2 y 3 posteriores a la incisión plantar. En este caso, la incisión quirúrgica se realizó el día 1 y se evaluó el comportamiento espontáneo utilizando el equipo de campo abierto con sensores para determinar la ubicación del animal en tiempo real (Omnitech Electronics, Inc., USA). Brevemente, los animales se colocaron individualmente en cajas de plexiglás (16 x 16 x 11.75 pulgadas) que contenían los fotosensores. Se evaluaron la actividad locomotora y la actividad vertical. Los datos crudos se analizaron utilizando el software Fusion v5.3 SuperFlex (Omnitech Electronics, Inc., OH, USA). En estas condiciones, los episodios de actividad espontánea se registraron durante 16 h (comenzando a las 17:00 h y finalizando a las 9:00 h del día siguiente) durante 4 días. Se analizó el comportamiento espontáneo durante la fase de luz (17: 00-18: 00 h) y la fase oscura (19: 00-07: 00 h). En todos los casos se midió la actividad horizontal (distancia total), los episodios verticales (actividad vertical) y el tiempo que los animales pasaron en el centro del sistema de campo abierto (segundos).

La actividad horizontal y vertical se ha propuesto para analizar indirectamente compuestos analgésicos potenciales (Imanaka et al., 2008; Majuta et al., 2017b), mientras que el tiempo pasado en el centro se ha utilizado como punto final para analizar la ansiedad efectos relacionados al dolor postquirúrgico (Robleda et al., 2014).

7.5.3 Análisis de datos

Los datos de los filamentos de von Frey se representan mediante diagramas de caja y bigotes o gráficos de barras indicando las medias \pm error estándar de la media. Se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman (Fig. 21A-C) o la prueba de Kruskal-Wallis (Fig. 21D). Además, para comparar el efecto global de los diferentes tratamientos, se calculó y analizó el área bajo la curva mediante el análisis de varianza paramétrico unidireccional (1W-ANOVA; Figura 1E).

En el caso de actividad espontánea, inicialmente se realizó una prueba de Grubb para excluir valores atípicos. Las gráficas se presentan como las medias \pm el error estándar de la media. Para analizar el comportamiento espontáneo antes (basal) y después (día 1) de la incisión plantar, realizamos una prueba t pareada para cada tratamiento (Fig. 23A). Además, para comparar el efecto de diferentes tratamientos durante 3 días, las diferencias se calcularon mediante el análisis de varianza paramétrico bidireccional de medidas repetidas (2W-RM-ANOVA) (en este caso no se asumió la esfericidad). A excepción de la prueba t pareada, en todos los casos, para controlar la tasa de descubrimiento falso ($q = 0.05$) para pruebas múltiples, usamos el procedimiento de aumento lineal de dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli. En todos los casos, la diferencia estadística se consideró como $p \leq 0.01$.

8. RESULTADOS

8.1. Aproximación experimental 1: Efecto de la administración recurrente de OXT en un modelo de dolor neuropático²

8.1.1. Experimentos conductuales

8.1.1.1. Protocolo 1: La estimulación eléctrica del NPV o la administración i.t. de OXT revierte la alodinia táctil.

Durante la prueba de 4 h (Fig. 13), la respuesta de retirada a la estimulación táctil con los filamentos de von Frey fueron estables para los grupo naïve ($\chi^2 = 1.287$, $n = 8$; $p = 0.936$), sham ($\chi^2 = 4.043$, $n = 6$; $p = 0.671$) y SNL (sin tratar) ($\chi^2 = 12.917$, $n = 8$; $p = 0.074$). De hecho, como se muestra en la Fig. 13A, las ratas naïve y sham mostraron un umbral de retiro estable (cercano a los 13 g), mientras que las ratas SNL mostraron una reducción en este umbral (<4 g), lo que indica que la cirugía SNL indujo alodinia táctil. Además, la alodinia táctil provocada por los filamentos de von Frey en ratas SNL se revirtió brevemente mediante estimulación eléctrica del NPV o por la administración i.t. de OXT (Fig. 13A). En ambos casos, el efecto antialodínico máximo se produjo 30 minutos después de la estimulación eléctrica del NPV o de la administración i.t. del neuropéptido. Al analizar estos datos como áreas bajo la curva (ABC) (Fig. 13B), encontramos que el comportamiento nocifensivo inducido por los filamentos de von Frey (retirada de la pata) se redujo en las ratas SNL tratadas con la estimulación eléctrica del NPV y OXT i.t. ($F_{3,24} = 160.364$; $p < 0.001$).

8.1.1.2. Protocolo 2: Efecto de la administración recurrente intratecal (i.t.) o intraplantar (i.pl.) de OXT en un modelo de dolor neuropático

Los resultados con los filamentos de von Frey mostraron que la ligadura de los nervios espinales L₅-L₆ redujo el umbral de respuesta de retiro de la pata (<4 g) en comparación con el grupo sham o naïve (> 12 g), lo que indica una sensibilización a los estímulos táctiles, que es un comportamiento similar al presentado en la alodinia táctil (Fig. 14A). Por el contrario, el grupo tratado con OXT (i.t. o i.pl.) presentó una marcada recuperación del umbral de retirada, con un efecto máximo a los 45 min después de la administración de OXT, alcanzando unos valores similares a los observados en el subgrupo Sham o Naïve (alrededor de los 12 g). Este efecto antialodínico se describe claramente en la Fig. 14B. Al analizar estos datos como ABC encontramos que la administración i.t. o i.pl. de OXT redujo significativamente ($p < 0.001$) el comportamiento nocifensivo.

² Los resultados de esta sección fueron publicados en Exp Brain Res. 2019; 237:2995-3010

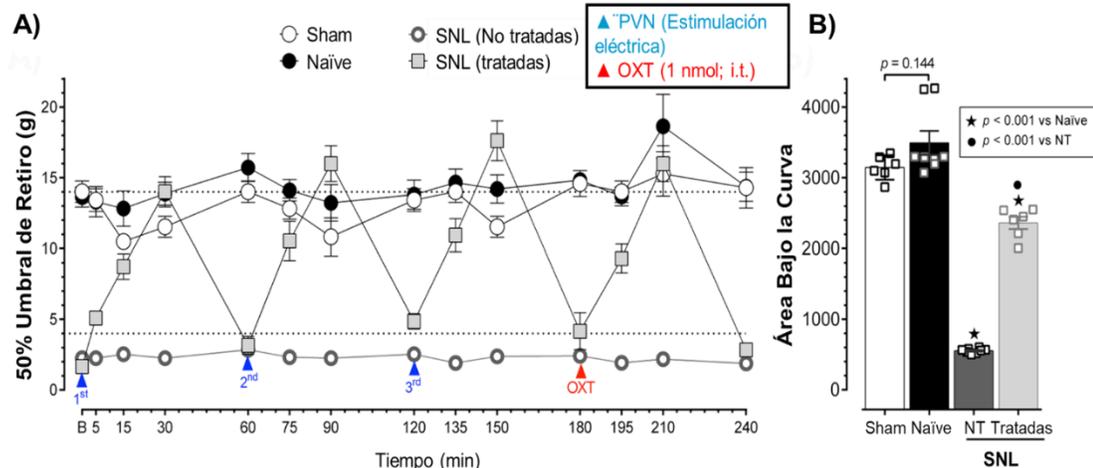


Figura 13. La estimulación eléctrica repetitiva del NPV o la administración espinal de OXT revierte la alodinia táctil inducida por SNL. A) Curso temporal (240 min) del umbral de retirada medido con filamentos de von Frey en ratas Naïve, Sham y SNL (tratadas [estimulación eléctrica (flecha azul); OXT i.t. (flecha roja)] y no tratadas [cuadrados]). Tenga en cuenta que la estimulación eléctrica del NPV (administrada tres veces a $t = 0, 60$ y 120 min; flechas azules) invierte la alodinia mecánica puntiforme inducida por SNL (en comparación con los grupos SNL no tratados) y se observaron efectos similares con una administración i.t. de OXT dada a $t = 180$ min (flecha roja). B) Efecto global de los tratamientos (estimulación del NPV o la administración i.t. de OXT) sobre el 50% del umbral de retirada. Los datos se expresan como media \pm el EEM. El análisis estadístico en (b) se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. ANOVA: Análisis de varianza, B: respuesta basal, NT: sin tratar, SNL: ligadura del nervio espinal, OXT: oxitocina, NPV: núcleo paraventricular del hipotálamo, EEM: error estándar de la media

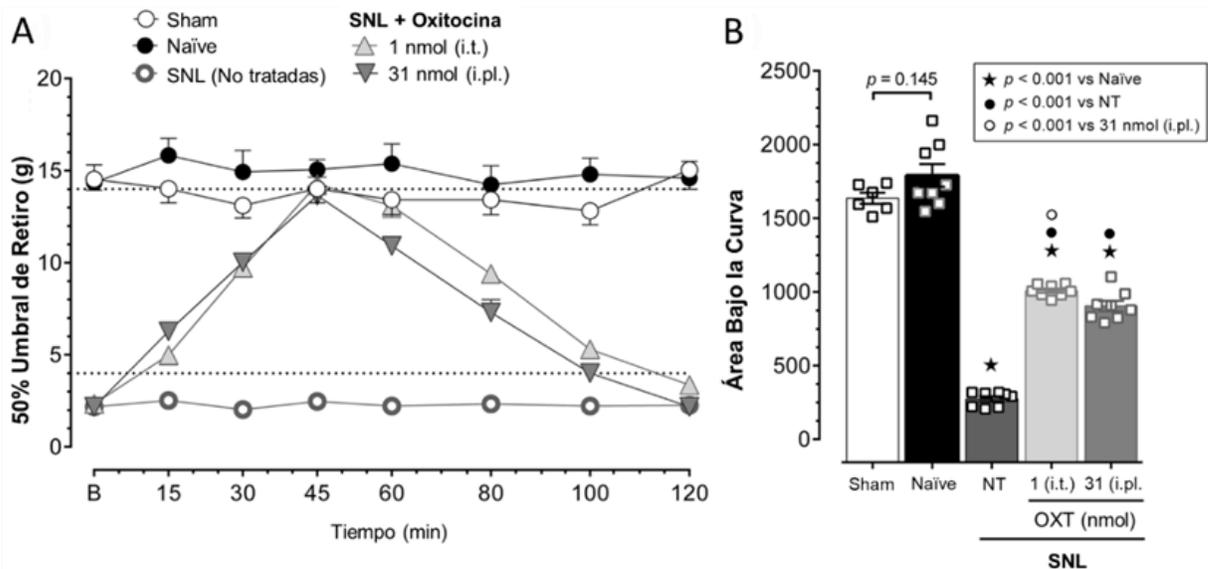


Figura 14. La OXT espinal o periférica revierte la alodinia táctil inducida por SNL. Curso temporal (a) o área bajo la curva (b) del efecto antialodínico observado después de la administración i.t. (1 nmol) o i.pl. (31 nmol) de OXT en ratas sometidas a SNL. El 50% del umbral de retiro se evaluó antes y después del tratamiento con OXT a los 15, 30, 45, 60, 80 y 100 min. A) Se observa la evolución temporal de los cambios después del tratamiento con OXT. B) El área bajo los valores de la curva se expresa con comparaciones estadísticas. Los datos se expresan como media \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. ANOVA Análisis de varianza, B respuesta basal, i.pl. intraplantar, i.t. intratecal, NT sin tratar, OXT oxitocina, SNL ligadura del nervio espinal, EEM error estándar de la media.

En el caso de la prueba de Hargreaves (hiperalgesia térmica), la Fig. 15A muestra que la latencia de retirada en el subgrupo naïve fue de aproximadamente 13.1 ± 0.6 s para el grupo vehículo y 14.0 ± 0.9 s para los no tratados. Por otro lado, la latencia de retirada para el grupo SNL se redujo a un valor de 4.0 ± 0.3 s (control) y 3.5 ± 0.2 s (vehículo). Por el contrario, la hiperalgesia térmica se revirtió parcialmente con la administración i.t. (7.8 ± 0.4 s) o i.pl. (8.9 ± 0.5 s) de OXT. El umbral de retiro en el día control entre la administración i.t. e i.pl. de OXT fue de 4.18 ± 0.33 s, que es un valor similar a las ratas SNL sin tratamiento; esto sugiere que la OXT no presenta un efecto residual, pero que es capaz de recuperar el efecto antihiperálgico si se vuelve a administrar.

Usando la prueba de Randall-Selitto (hiperalgesia mecánica), observamos que el umbral de retiro de las ratas del grupo naïve fue de 185.6 ± 5.2 g para el grupo control y 196.3 ± 7.2 g para el grupo con vehículo (Fig. 15B). Por el contrario, el umbral de retiro para las ratas con ligadura fue de 71.3 ± 4.6 g y 86.3 ± 4.9 g para el grupo control y los animales tratados con vehículo. Por otra parte, la disminución en el umbral de retiro se revirtió parcialmente en las ratas SNL tratadas con OXT i.t. (170.6 ± 5.4 g) o i.pl. (144.4 ± 3.4 g). Nuevamente, el umbral de retiro en el día control entre la administración i.t. e i.pl. de OXT fue de 90.7 ± 6.0 g, un valor similar a los obtenidos en las ratas SNL no tratadas; esto sugiere que la OXT no presenta un efecto residual (caja gris claro), pero que es capaz de recuperar el efecto antihiperálgico si se vuelve a administrar.

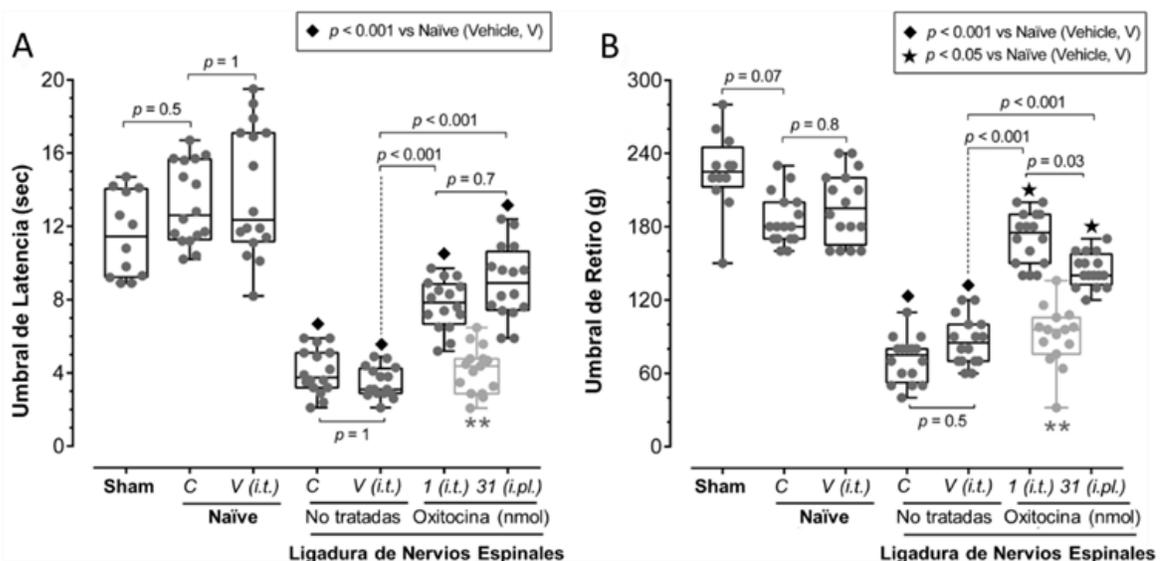


Figura 15. La OXT espinal o periférica revierte la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por SNL. Los diagramas de cajas y bigotes muestran los resultados obtenidos de la prueba de Hargreaves (A) y la prueba de Randall-Selitto (B). El tratamiento con OXT i.t. o i.pl. revierte parcialmente hiperalgesia inducida por SNL. Ambas pruebas se realizaron en días diferentes y en el mismo grupo de ratas. *Para evitar un posible sesgo, se realizó una prueba de control interno en el grupo tratado con OXT entre tratamientos (ver caja gris en el gráfico); los resultados muestran que no se encontraron efectos antinociceptivos residuales 1 día después de la administración i.t. de OXT. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía para medidas repetidas (con corrección de Greenhouse-Geisser) seguido de una prueba post hoc de Tukey. Análisis de varianza ANOVA, i.pl. intraplantar, i.t. intratecal.

8.1.2. Experimentos electrofisiológicos

Se realizaron experimentos electrofisiológicos en un total de 29 ratas (correspondientes al protocolo 1; Fig. 6), aunque sólo se lograron registros exitosos en un total de 15 ratas (segundo subgrupo = 3 células; tercer subgrupo = 2 células; cuarto subgrupo = 5 células; y quinto subgrupo = 5 células). En ratas con ligadura en los nervios espinales, se encontró un campo receptivo más grande y difuso (Suzuki et al. 2000), esto podría deberse a una degeneración Walleriana (Montoya et al. 2002; Ye et al. 2015). Sin embargo, los registros extracelulares en las neuronas del asta dorsal se realizaron exclusivamente a partir de neuronas WDR con un campo receptivo específico localizado en la pata trasera izquierda (ipsilateral a la ligadura). Estas neuronas se caracterizaron de acuerdo con las propiedades de sus respuestas a la estimulación del campo receptivo periférico y se clasificaron como neuronas de amplio rango dinámico (WDR), ya que presentaron respuestas de fibras A β , A δ y C después de la estimulación eléctrica del campo receptivo. Dado que en algunos experimentos las neuronas se registraron a una profundidad media de 1235 ± 247 μm por debajo de la superficie (utilizando el sistema Microdrive Eckhorn), esto podría indicar que las células se encontraron principalmente en la lámina V del asta dorsal. De hecho, en algunos casos, las células WDR registradas con microelectrodos de vidrio, se marcaron iontoforéticamente en la lámina V (Fig. 16).

8.1.2.1. Protocolo 2: La administración espinal de OXT parece disminuir la actividad neuronal evocada de las neuronas WDR 25 días (o más) después de la ligadura de los nervios espinales

Con este protocolo, el número de animales con respuestas WDR específicas fue bajo ($n=3$ en el segundo y $n=2$ en el tercer subgrupo). En general, existía una falta de actividad en la médula espinal, sin embargo, se localizó una neurona silenciosa, que respondía con altas tasas de disparo cuando se inyectaba corriente. Aunque los datos de la actividad neuronal asociada con las fibras A β , A δ y C en neuronas WDR se registraron dentro de los rangos de 0 – 20 ms, 21 – 90 ms y 90 – 350 ms, respectivamente, no hubo suficientes datos para realizar un análisis estadístico. Independientemente, la Fig. 16 muestra un ejemplo de las neuronas WDR registradas en estos animales.

Aunque la administración de OXT disminuyó las respuestas neuronales producidas por la estimulación eléctrica del campo receptivo, las neuronas WDR registradas no arrojaron datos estadísticamente significativos (Fig. 17). En este punto, se debe tener en cuenta la degeneración Walleriana de las fibras aferentes primarias (es decir, desaferentación) que podría ser significativa 25 días después de la ligadura de los nervios espinales, impidiendo registrar neuronas WDR con entradas periféricas confiables (Montoya et al., 2002; Ye et al., 2015). Debido a esto, se realizaron experimentos electrofisiológicos adicionales con animales que tenían entre 15 y 17 días posteriores a la SNL, similar a otros estudios electrofisiológicos (Chapman et al., 1998; Dalmolin et al., 2017).

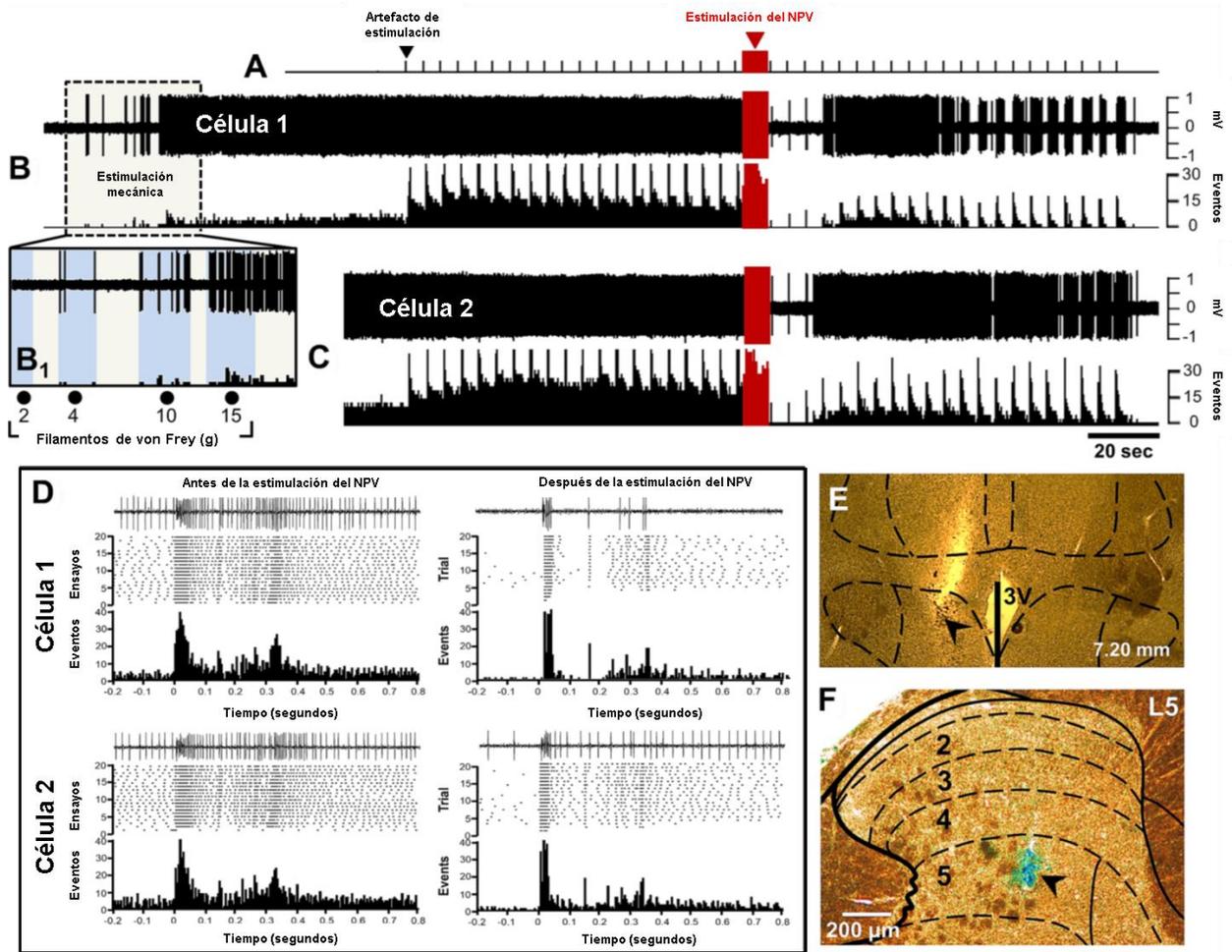


Figura 16. Efecto de la estimulación eléctrica del NPV sobre la actividad neuronal de células WDR de ratas con SNL. A) Artefactos de estimulación en el campo receptivo (flecha negra) y estimulación eléctrica del NPV (en rojo); Se administraron 20 estímulos al campo receptivo antes y después de los estímulos en el NPV. B) Se observó el registro electrofisiológico de la célula WDR (célula 1; arriba) y el histograma de la descarga de frecuencia instantánea (abajo). Observe la reducción de las respuestas neuronales evocadas después de la estimulación del NPV. Es interesante notar el aumento de la descarga neuronal espontánea tras la estimulación mecánica con los filamentos de von Frey (B1). C) Otra célula WDR (célula 2) presenta cambios similares después de la estimulación en el NPV. D) Registro electrofisiológico de la estimulación eléctrica única del campo receptivo (canal superior) y el diagrama de trama (medio) y el histograma periestimulo (abajo) generado por 20 estímulos antes (izquierda) y después (derecha) de la estimulación eléctrica del NPV para las células 1 y 2. Se debe tener en cuenta que una disminución selectiva de las respuestas nociceptivas neuronales (fibras A δ y C) evocadas entre 0.05 y 0.4 s. E) Una lesión electrolítica histológica en la parte rostral del NPV (flecha negra). F) Una sección histológica de la médula espinal mostró la ubicación de la célula registrada, se marcó usando pontamina azul (flecha negra). Ligadura del nervio espinal SNL, núcleos paraventricular del hipotálamo NPV, células WDR de amplio rango dinámico.

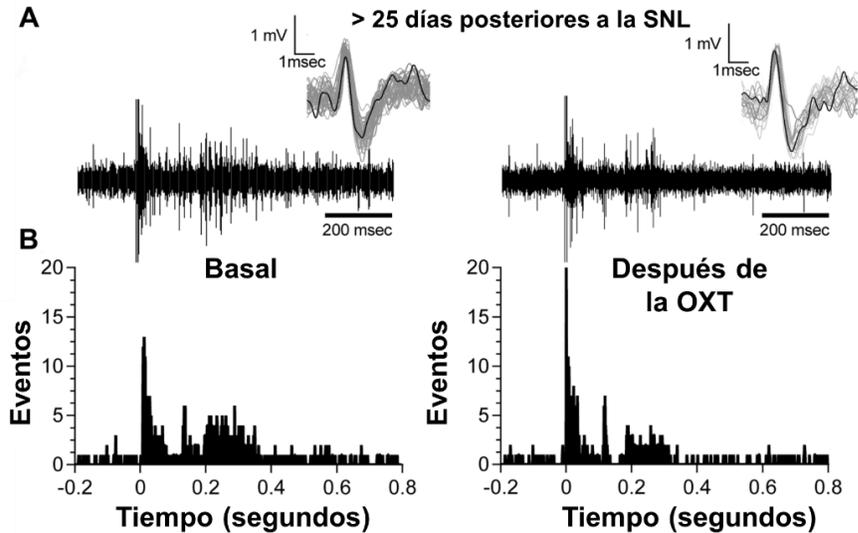


Figura 17. Registro de células WDR e histograma peri-estímulo en ratas con más de 25 días después de la SNL. A) Datos brutos neuronales evocados de la estimulación periférica única (basal) y después de la administración tópica espinal de OXT (1 nmol). B) Histograma peri-estímulo construido por 20 estímulos del campo receptivo antes y después de la administración de OXT. Se observa la disminución de las respuestas evocadas nociceptivas entre 0.2 y 0.4 s. Es importante notar que este tipo de célula fue muy difícil de registrar en estas ratas, probablemente por una hiperpolarización de este tipo de célula. Oxitocina OXT, ligadura del nervio espinal SNL.

8.1.2.2. Protocolo 3: La estimulación eléctrica del NPV o la administración espinal de OXT disminuye la actividad neuronal evocada de las neuronas WDR entre 15 y 17 días después de la ligadura de los nervios espinales

La Figura 17 muestra las respuestas neuronales espinales evocadas de las neuronas WDR convergentes en animales entre los 15 y 17 días posteriores a la ligadura de los nervios espinales. En este grupo de ratas, se aumentó la tasa de éxito para registrar neuronas de amplio rango dinámico; esto permitió analizar estadísticamente el efecto de la administración espinal de OXT en las respuestas neuronales evocadas. La figura 18A muestra los datos brutos de una única respuesta de las neuronas WDR obtenida antes y después de la administración de 1 nmol de OXT (administrada por vía espinal). El histograma peri-estímulo construido a partir de 20 respuestas evocadas (Fig. 18B) sugiere que después de la administración de OXT, el número de potenciales evocados asociados con la activación de las fibras A δ y C disminuye.

Cuando estos datos se grafican como un curso temporal del cambio porcentual de la actividad neuronal (Fig. 18C; usando el ANOVA bidireccional de medias repetidas) se observa que la administración espinal de OXT disminuye selectivamente la actividad neuronal de las fibras A δ - ($F_{1,8} = 52.192$; $p < 0.001$) y C ($F_{1,8} = 19.821$; $p = 0.002$), pero no de las fibras A β ($F_{1,8} = 2.481$; $p = 0.154$). Estos datos fueron obtenidos a partir de 10 unidades ($n = 5$ unidades naïve y $n = 5$ neurona de ratas con SNL).

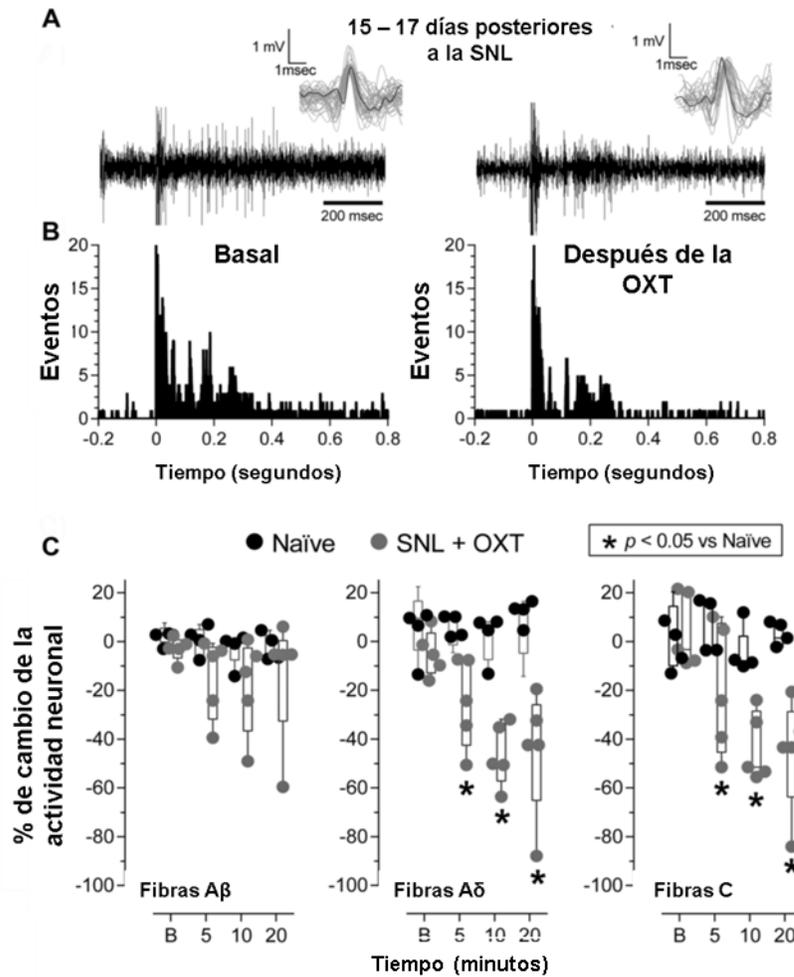


Figura 18. Efecto de la OXT espinal sobre la actividad neuronal de las células WDR en ratas con 15-17 días posteriores a la ligadura de los nervios espinales. A, B) Las respuestas brutas (superior) y el historial peri-estímulo (abajo) obtenidas en los experimentos electrofisiológicos. Se observa que después de administrar 1 nmol de OXT, se reduce la respuesta neuronal evocada. La respuesta evocada neuronal es marcadamente menor (200 y 400 ms), correspondiente a la respuesta de las fibras C. C) Efecto temporal de la OXT sobre las fibras A β , A δ y C en células WDR de ratas sin tratamiento previo y SNL (% de cambio de la actividad neuronal). La OXT no tiene una disminución significativa en la actividad neuronal asociada a la activación de las fibras A β . En (C) el análisis estadístico se realizó utilizando un RM ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. RM ANOVA análisis de varianza de medidas repetidas, oxitocina OXT, ligadura del nervio espinal SNL.

8.2 Aproximación experimental 2: Evaluación del posible mecanismo de acción de la administración espinal de OXT en el modelo de la formalina³

8.2.1 Efecto de la administración de OXT en la nocicepción temprana y tardía inducida por la formalina

La administración s.c. de 1% de formalina, genera un patrón bifásico que corresponde a una respuesta de sacudida de la pata (Fig. 19) Dicha respuesta consta clásicamente de dos fases, una nociceptiva (Fase I; Fig. 19) y una inflamatoria (Fase II; Fig. 19), así como un incremento en la sensibilidad mecánica, medible a partir del tercer día y hasta 30 días después de la administración de la formalina (Fig. 19). El efecto pronociceptivo en la fase II, fue bloqueado por el diclofenaco un medicamento antiinflamatorio no esteroideo que normalmente se utiliza en la clínica (100 µg/pata s.c. Fig. 19B, B1 y B2).

8.2.2 Efecto de la administración de OXT o de la estimulación del NPV en la nocicepción temprana (fase I y II) y tardía (fase III) inducida por formalina

La estimulación eléctrica del NPV (Fig. 19) disminuyó la nocicepción tanto en la fase I (Fig. 19B1) como en la fase II (Fig. 19B2) ($p \leq 0.001$). Mientras que, la administración i.t. de OXT (1-10 nmol/rata) disminuyó la nocicepción en la fase II (Fig. 19B2), no así, en la fase I (Fig. 19B1). Sin embargo, en la fase II, la administración de 10 nmol/rata de OXT, tuvo un efecto antinociceptivo ($p \leq 0.001$), el cual parece ser mayor que el del diclofenaco, y similar al alcanzado por la estimulación eléctrica del NPV. Por otra parte, la estimulación eléctrica del NPV bloqueó la aparición de la nocicepción tardía (FIII) promovida por la administración de formalina (Fig. 19C y C1), Sin embargo, la administración de 1 nmol de OXT, no es capaz de bloquear la aparición de la nocicepción tardía (FIII; Fig. 19C y C1), mientras que la administración i.t. de 10 nmol de OXT promueve la recuperación del umbral nociceptivo (FIII; Fig. 19C y C1).

8.2.3 Efecto del L-368,899, PTX, galeina y U-73122 (agregar tabla de fármacos y selectividades) en la antinocicepción temprana y tardía inducida por la OXT

La administración i.t. del antagonista específico del receptor a OXT, el L-368,899 (10 nmol) bloqueó el efecto antinociceptivo en la FII (Fig. 20B, B1 y B2) y tardío (FIII) de la OXT (Fig. 20C, C1) en la prueba de la formalina. Mientras que la administración del inhibidor de las subunidades $G_{i\alpha}$, toxina *Pertussis* (PTX; 1 µg) o del inhibidor de las subunidades $G_{\beta\gamma}$, galeina (GAL; 137 nmol), bloquearon el efecto antinociceptivo tardío (FIII) de la OXT (Fig. 20C y C1), pero no tuvieron ningún efecto sobre la antinocicepción temprana (principalmente en la FII) promovida por la OXT (Fig. 20B1 y B2).

³ Los resultados de esta sección fueron publicados en ACS Chem Neurosci. 2021;12(16):3140-3147.

Por otra parte, la administración del inhibidor de la fosfolipasa C, U-73122 (4 nmol) bloqueó el efecto antinociceptivo temprano (Fig. 19B1 y B2) promovido por la OXT más no el efecto tardío (Fig. 19C y C1). Además, la administración de L-368,899, PTX, GAL o U-73122, *per se* no afectaron la nocicepción inducida por formalina (ver apéndice Fig. Supl. 1).

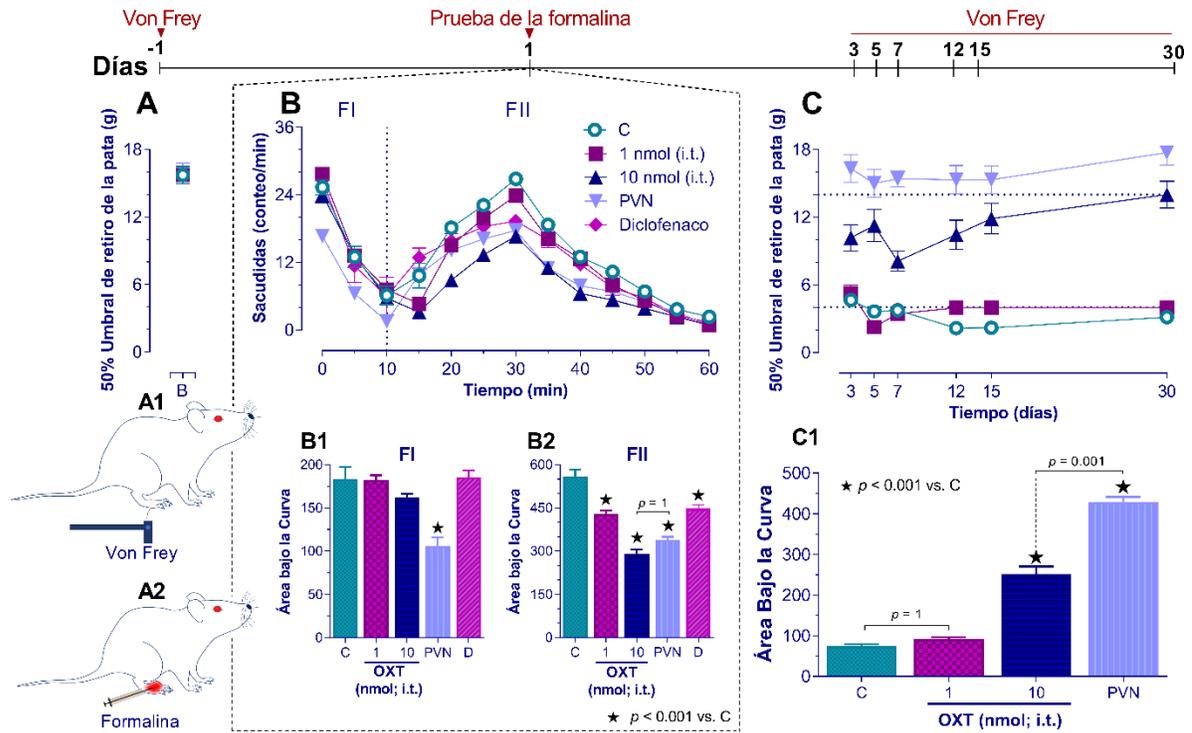


Figura 19. La OXT espinal o la estimulación eléctrica del NPV inhibe la nocicepción temprana (0 - 1 h) y tardía (>3 días) inducida por formalina al 1%. El panel (A) muestra los valores del umbral de retirada de la pata (inducido por los filamentos de von Frey (A1) medidos 1 día antes de la prueba de formalina (A2). El umbral de retirada de la pata de los animales muestra que no hubo comportamientos nociceptivos antes de la prueba de formalina. En (B) se observa el comportamiento nocifensivo expresado como sacudidas de la pata inducidos por formalina subcutánea; la formalina indujo un curso de temporal bifásico característico, a saber, fase I (FI) y fase II (FII) del número medio por minuto de sacudidas de pata. En contraste con la situación de control (c), el pretratamiento intratecal (i.t.) con OXT (10 nmol; administrado 10 min antes de la formalina) disminuye el comportamiento de estremecimiento de la PII resultados similares a los obtenidos con el pretratamiento con diclofenaco (100 µg/pata s.c.), mientras que la estimulación eléctrica de PVN (administrada 10 min antes de la formalina) reduce el comportamiento de sacudida en ambas fases (FI y FII), alcanzando valores superiores a los del diclofenaco. Los paneles (B1) y (B2) muestran las áreas bajo la curva (ABC) correspondientes al comportamiento de estremecimiento durante el transcurso del tiempo de la prueba de formalina. En (C) se representa la evolución temporal del umbral de retirada de la pata inducida por formalina a lo largo de 30 días; los datos muestran que el pretratamiento con OXT (10 nmol) o la estimulación eléctrica de la PVN (administrada el día 1, antes de la formalina) disminuyen la nocicepción tardía (retirada de la pata). El panel (C1) muestra el AUC obtenido del curso tardío del umbral de retirada de la pata. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA simple seguido de la prueba post hoc de Tukey.

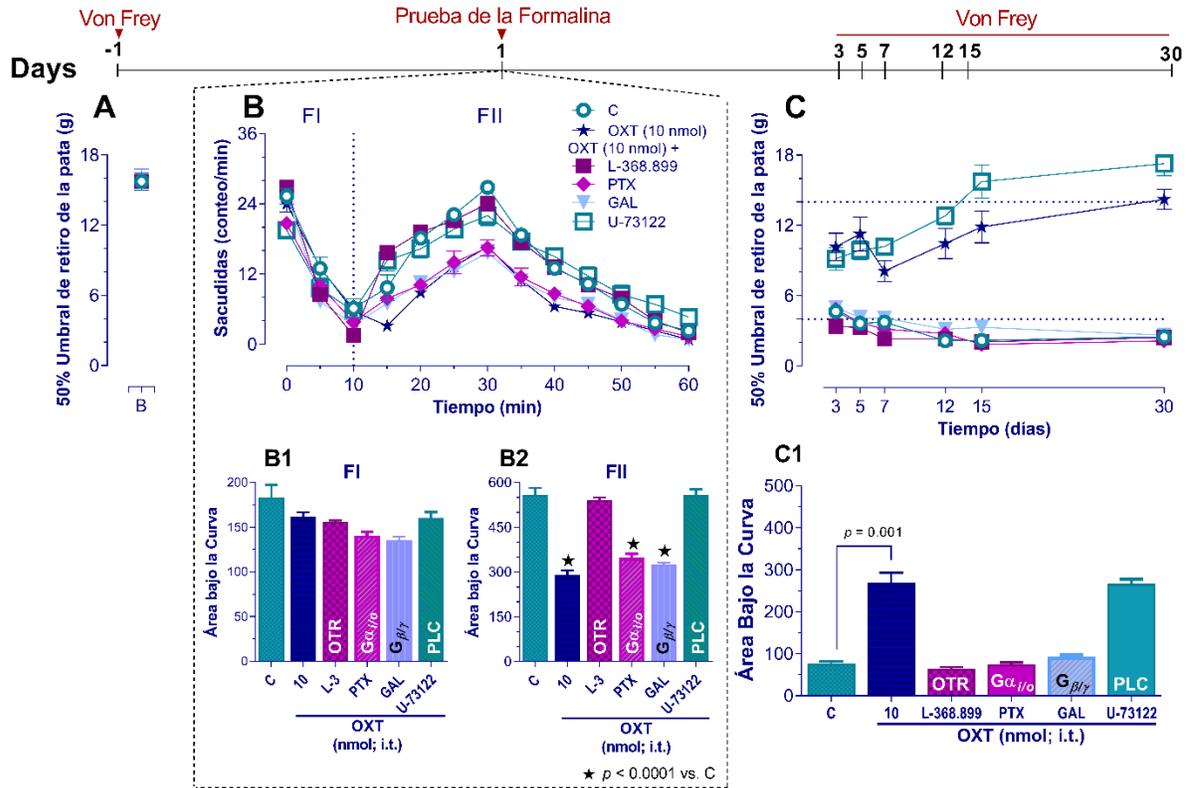


Figura 20. El bloqueo del OTR inhibe la antinocicepción temprana (0 – 1 h) y tardía (>3 días) que se induce por la OXT espinal probablemente por la activación diferencial de dos proteínas G. (A) Umbral de retiro de la pata (inducido por filamentos de von Frey). El panel (B) muestra el curso temporal temprano durante la fase I (FI) y la fase II (FII) del número de sacudidas de la pata por minuto provocados por la formalina observados durante: (i) situación de control (c); (ii) o después de i.t. 10 nmol OXT (10). Además, el efecto del pretratamiento (antes de OXT) con: (i) L-368,899 (antagonista de OTR); (ii) Toxina *Pertussis* (PTX, inhibidor de la proteína $G_{\alpha i/o}$); (iii) galeína (GAL, inhibidor de señalización de la subunidad $G_{\beta/\gamma}$) o (iv) del U-73122 (inhibidor de los procesos de la fosfolipasa C_{β} , PLC_{β}). Tenga en cuenta que L-368,899 y U-73122 inhibieron el efecto de OXT. El panel (B1) y (B2) resume el efecto de los diferentes tratamientos durante la nocicepción temprana provocada por la formalina. El pretratamiento con L-368,899 o U-73122 bloquea la acción antinociceptiva inducida por OXT, señalando el papel de los mecanismos dependientes de la activación del OTR y la PLC_{β} . Por el contrario, PTX o GAL no tuvieron ningún efecto sobre la antinocicepción temprana inducida por OXT. En el caso de la nocicepción tardía inducida por formalina, el panel (C) ilustra la evolución temporal del umbral de retiro de la pata y muestra que, aunque la acción antinociceptiva de OXT está bloqueada por el antagonista de OTR, el papel de la señalización de la PLC_{β} parece no ser relevantes, mientras que los mecanismos dependientes de $G_{\alpha i/o}$ (bloqueados por PTX) o $G_{\beta/\gamma}$ (bloqueado por GAL) adquieren relevancia. Es importante enfatizar que, con excepción de OXT, todos los compuestos (PTX, GAL o U-73122) carecen de cualquier efecto per se sobre la nocicepción temprana y tardía inducida por formalina (ver Sección 17.1; Figura 24). Juntos, estos datos sugieren que la antinocicepción temprana y tardía inducida por OXT está guiada por dos vías intracelulares diferenciales, en ambos casos mediadas por la activación de OTR. El análisis estadístico se determinó mediante un análisis simple de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey.

8.2.4 Efecto del L-NAME, ODQ o glibenclamida en la antinocicepción temprana inducida por OXT

La administración i.t. del inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME (370 nmol), el inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ (50 nmol) o del bloqueador de los canales K_{ATP} , glibenclamida (100 nmol), bloquearon el efecto antinociceptivo temprano de la OXT durante la prueba de la formalina, (Fig. 21). Además, la administración del L-NAME, ODQ o glibenclamida *per se* no afectaron la nocicepción inducida por formalina (ver apéndice Fig. Sup. 2).

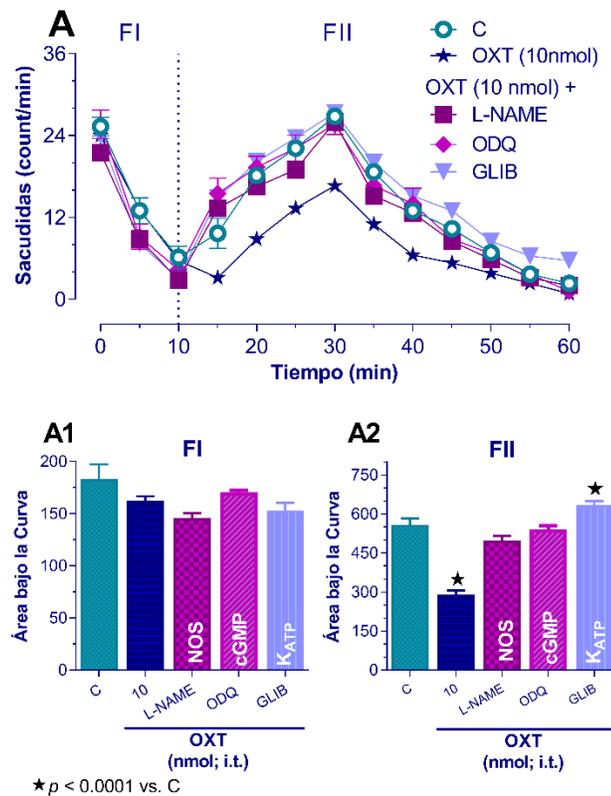


Figura 21. El papel de la vía OTR/PLC β /NO/ K_{ATP} en la antinocicepción temprana (0-1 h) inducida por OXT. En (A) se representa el curso temporal de los diferentes tratamientos durante la fase I (FI) y la fase II (FII) del número de sacudidas de la pata minuto. La antinocicepción inducida por la administración i.t. de OXT (10 nmol) se suprimieron por el pretratamiento con: (i) clorhidrato de éster metílico de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa [NOS]); (ii) ODQ (un inhibidor de la guanilil ciclasa soluble [GC]); o (iii) glibenclamida (GLIB, bloqueador de los canales de K^+_{ATP}). El panel (A1) y (A2) muestra el efecto de los diferentes tratamientos durante la nocicepción temprana provocada por la formalina. Tenga en cuenta que la inhibición de las respuestas nociceptivas por OXT en la FII fue revertida por L-NAME, ODQ y GLIB, lo que sugiere que el efecto antinociceptivo temprano de OXT podría estar guiado por la activación de la vía OTR/PLC/NO/GMPc/ K_{ATP} . Es importante enfatizar que con excepción de OXT, todos los compuestos (L-NAME, ODQ y GLIB) carecen de cualquier efecto *per se* sobre la nocicepción temprana y tardía inducida por formalina (ver sección 17.1. Figura 25). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis simple de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey.

8.3 Aproximación experimental 3: Efecto de la administración de OXT en conductas espontáneas en un modelo de dolor postquirúrgico⁴

8.3.1 Efectos de la OXT sobre los umbrales mecánicos en un modelo de dolor postquirúrgico

Para evaluar el efecto del pretratamiento con OXT en un modelo de dolor postquirúrgico se usó una n=48 animales, separados en dos grupos (cada uno con una n=24; ver Fig. 11), donde se analizó el efecto de la OXT sobre: (i) la nocicepción evocada por filamentos de von Frey y (ii) el comportamiento espontáneo (como modelo sustituto de dolor espontáneo).

8.3.1.1 Umbrales mecánicos después de la incisión plantar

Los animales del grupo control (n=6) no mostraron ninguna diferencia en su umbral de retiro hacia los filamentos de von Frey (522 mN) a lo largo de la prueba (Fig. 22). Mientras que, la hiperalgesia mecánica evaluada con los filamentos de von Frey se presentó en los grupos en los que se realizó la incisión plantar, donde el umbral de los animales disminuyó de los 522 mN a ~50 mN al día 1 después de la incisión (Fig. 22A y 22B). Lo que demuestra que la generación de la sensibilización es por la incisión y no por la estimulación táctil por parte de los filamentos.

8.3.1.2 La OXT espinal disminuye la hiperalgesia mecánica inducida por incisión plantar

Por otra parte, los animales a los que se les administró OXT (10 nmol) de manera espinal 10 minutos antes de realizar la cirugía, no disminuyeron su umbral por debajo de los 70 mN al día 1 (Fig. 22C), aumentando significativamente al día 5 y recuperando sus valores iniciales al día 7, esto en comparación con los grupos Cirugía y Cirugía + V, en los cuales se observa una recuperación significativa hasta el día 8 de la prueba (Fig. 22A y B). Esto podría indicar que la OXT disminuye significativamente los tiempos de recuperación (representado como un aumento en el umbral) debido a un posible efecto preventivo, cuando es administrada antes de llevar a cabo un procedimiento quirúrgico. Además, el efecto global de los tratamientos (medido ABC) muestra que los animales pretratados con OXT tienen un mayor efecto antinociceptivo que el de los otros dos grupos, por lo cual inferimos que la OXT tiene un efecto analgésico en un modelo de dolor postquirúrgico (Fig. 22E).

⁴ Los resultados de esta sección fueron publicados Front Pharmacol. 2020;11:581544

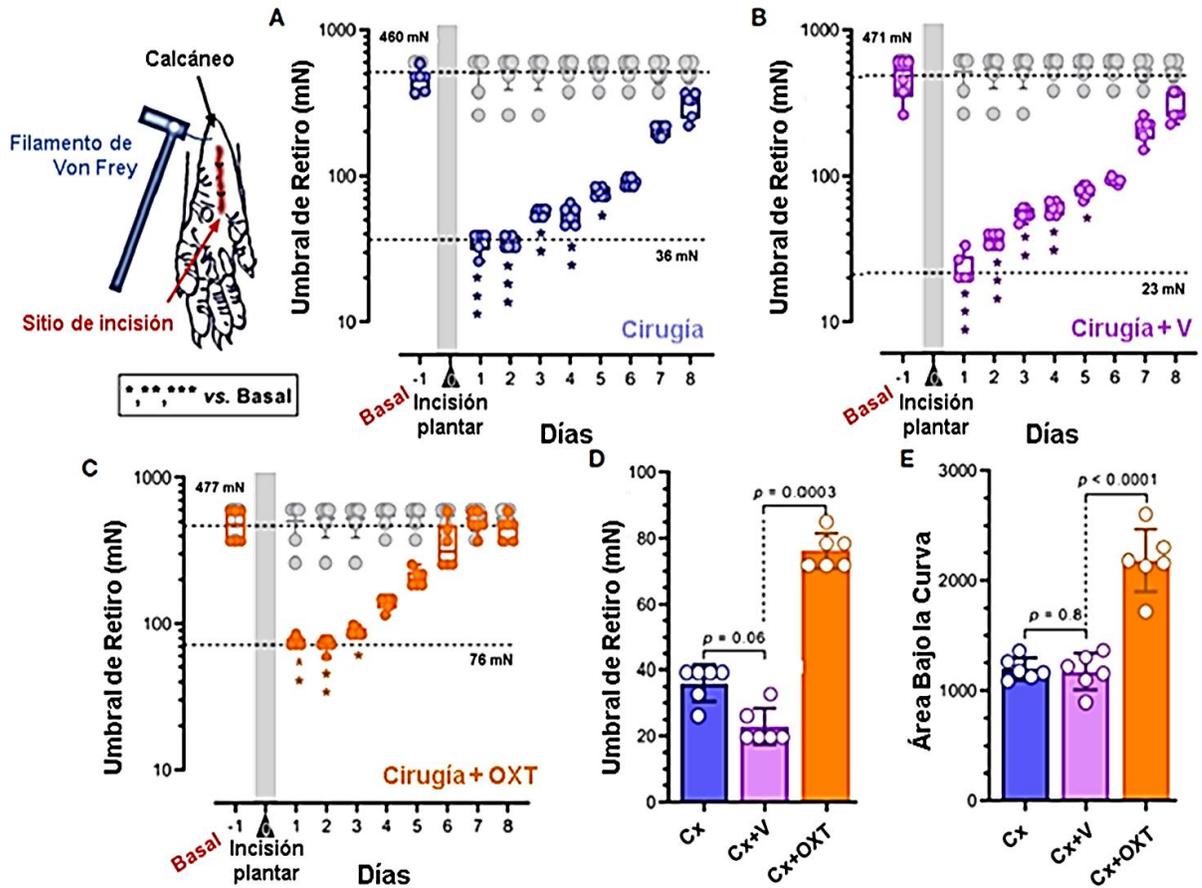


Figura 22. La administración espinal de OXT disminuyó el dolor evocado en un modelo de dolor postquirúrgico. (A – C) muestran los diagramas de caja del umbral de retiro antes (basal) y después (comenzando 1 día después de la cirugía durante 8 días) de la incisión plantar en animales sin pretratamiento (cirugía sola; azul) o pretratados con vehículo (V + Cirugía; magenta) o 10 nmol OXT (OXT + Cirugía; naranja), estimulados con los filamentos de von frey; además, se incluye en estos paneles los datos de ratas NÄIVE (ver diagrama de caja gris). Bajo anestesia, se administró vehículo u OXT por vía intratecal 10 minutos antes de la incisión plantar. Las fuerzas aplicadas por los filamentos de von Frey en el área plantar de la pata trasera de la rata se expresan en milinewtons (mN). En todos los casos, las medias del umbral de retiro basal fueron similares (≥ 460 mN), y se observó una clara reducción de este valor un día después de la cirugía (≤ 76 mN); estos datos indican que la incisión plantar induce hipersensibilidad mecánica. Además, el tiempo necesario para no encontrar diferencias en el umbral de retirada fue menor en los animales pretratados con OXT (3 días frente a 5 días), lo que sugiere una mejora en los tiempos de recuperación. Los asteriscos *, **, *** indican $p < 0.01, 0.001, 0.0001$ frente al valor basal. (D) muestra las medias \pm errores estándar (EE) de los umbrales de retirada de los diferentes grupos un día después de la cirugía; tenga en cuenta que la hipersensibilidad en animales pretratados con OXT parece ser menor que la de los grupos Cirugía o Cirugía + V. Además, (E) muestra el efecto global de los tratamientos como la media de las áreas bajo las curvas (ABC) \pm el error estándar; Dado que el ABC de los animales pretratados con OXT es mayor que el de los otros dos grupos, por lo cual inferimos que la OXT tiene un efecto analgésico en un modelo de dolor postquirúrgico.

8.3.2 Actividad espontánea en los animales control

En ratas, existen variaciones tanto diurnas como nocturnas marcadas en la actividad horizontal, la actividad vertical, así como en la actividad ambulatoria. Cuando los animales se colocan por primera vez en las cajas de actividad durante la fase de luz (17:00 horas), las ratas exploran activamente el nuevo entorno durante aproximadamente 1 hora. Después de esta exploración inicial, la mayoría de los animales se mantienen en reposo o tienen una marcada reducción en la actividad hasta el comienzo de la fase oscura (19:00 horas), es aquí cuando los animales muestran nuevamente aumentos significativos en la actividad locomotora durante las horas nocturnas (19:00 - 07:00 horas) la cual disminuye una vez que se vuelve a encender la luz de la habitación (07:00 – 09:00 horas). Este período de mayor actividad durante el día (17:00 - 18:00 horas) es consistente con el comportamiento exploratorio de los animales en busca de posibles amenazas dentro de un entorno nuevo, mientras que el aumento de la actividad inmediatamente después de que la habitación se oscurezca (19:00 – 7:00 horas) es consistente con la actividad común de cuidado de las ratas como lo es beber, hacer nidos y explorar su entorno en busca de comida. Esta actividad espontánea se ve reducida cuando existe alguna lesión en el cuerpo, esta lesión disminuye la actividad inicial o exploratoria, así como la actividad común en los grupos que fueron sometidos al procedimiento quirúrgico en comparación con el grupo control, esto puede observarse tanto en los actogramas como en los mapas de calor pertenecientes a los diferentes grupos estudiados (Fig. 23).

8.3.2.1 El efecto de la incisión plantar sobre la actividad ambulatoria

La incisión plantar realizada en la pata trasera de la rata genera una marcada hiperalgesia lo que provoca una disminución en la actividad ambulatoria de los animales dentro del equipo de campo abierto. La Fig. 23 muestra los actogramas y mapas de calor representativo de la actividad locomotora de ratas Naïve (Fig. 23A), cirugía no tratada (Fig. 23B), vehículo + cirugía (Fig. 23C) y OXT + cirugía (Fig. 23D) obtenidas durante las 16 h de grabación antes (actividad basal, B) y después (día 1, 2 y 3) de la cirugía.

Como se muestra en los actogramas, cuando los animales se colocaron por primera vez en las cajas de actividad durante la fase de luz (a las 17:00 h), exploraron activamente el entorno novedoso; tras esta exploración inicial, los animales permanecieron con baja actividad (entre las 18:00-19:00 h) hasta el inicio de la fase oscura (luces apagadas a las 19:00 h). En el grupo sin tratamiento previo (Figura 23A), se observó claramente un aumento en la actividad locomotora durante la fase oscura; esta actividad espontánea disminuyó después de la cirugía en los grupos de cirugía no tratada (Figura 23B) y cirugía + vehículo (Figura 23C).

De hecho, se logró una reducción visual en la intensidad de los actogramas y mapas de calor después de la incisión quirúrgica (ver subpaneles d1). Por el contrario, los animales tratados previamente con OXT (Figura 23D) mostraron un deterioro menor de la actividad locomotora espontánea; de hecho, al tercer día de la cirugía, la actividad locomotora y el mapa de calor fueron similares a la respuesta basal.

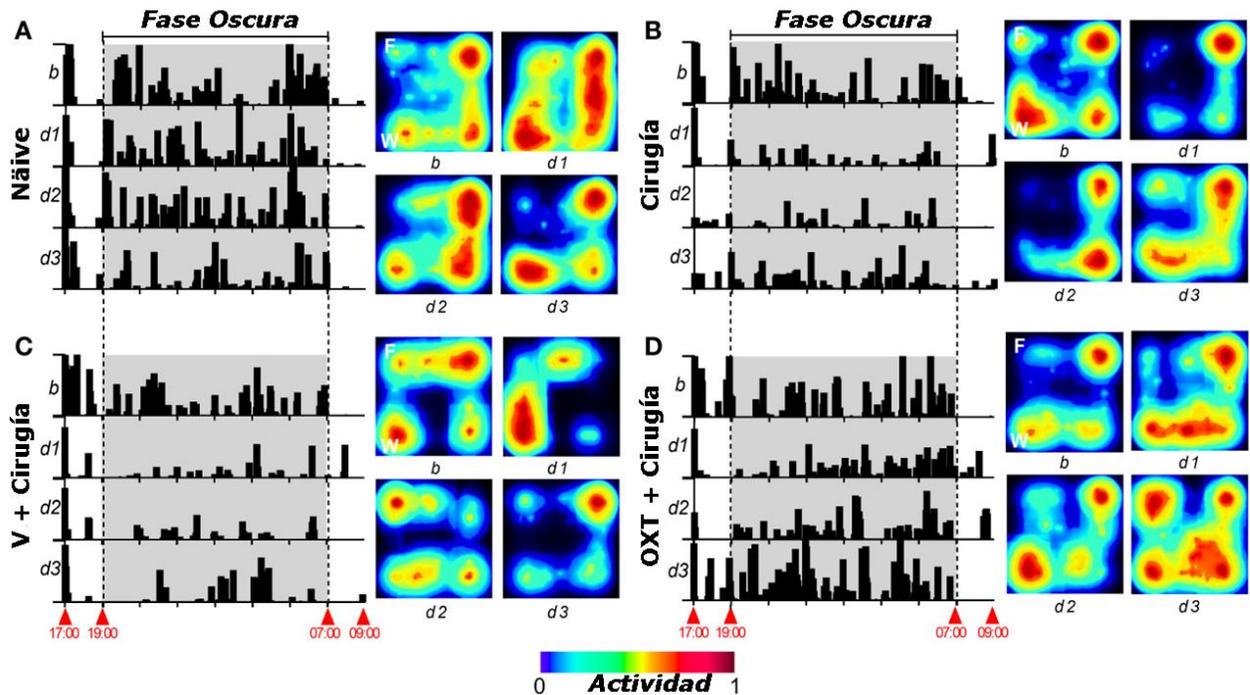


Figura 23. Actividad ambulatoria y mapas de calor representativos de diferentes tratamientos antes y después del procedimiento quirúrgico. En todos los paneles, a la izquierda, se muestra un actograma de la actividad ambulatoria de los animales. Los datos se obtuvieron mediante un registro de 16 h entre las 17: 00 y las 09:00 h durante 4 días, donde **b** representa el valor basal y **d1**, **d2** y **d3** representan el día 1, 2 y 3 posteriores a la cirugía en la pata trasera (incisión plantar). A la derecha de cada panel, se muestra un mapa de calor representativo de la actividad locomotora horizontal. En el caso de animales Naïve (A), los actogramas y el mapa de calor son similares en los días de prueba; tenga en cuenta que, de acuerdo con los mapas de calor, los animales Naïve se mueven por el equipo de campo abierto en un patrón similar durante todos los días de prueba. Cuando los animales fueron sometidos a una incisión en la pata trasera (B – D), la actividad se vio claramente afectada en **d1**. Además, en el **d3** la actividad espontánea se recuperó parcialmente (en comparación con la condición basal) en los grupos Cirugía y Vehículo + Cirugía. En el caso de los animales pretratados con 10 nmol de oxitocina (OXT) (D), se registró un impacto mínimo en la actividad en el **d1** y se logró una recuperación completa de la actividad en el **d3**.

Además, como se muestra en la Fig. 24, después de la incisión plantar, la distancia total recorrida y la actividad vertical tienden a disminuir en los grupos de cirugía, vehículo + cirugía y OXT + cirugía; este efecto no se observa en los animales no tratados previamente ($p > 0.2$). Aunque se obtuvieron resultados similares en el tiempo de permanencia en el centro durante la hora exploratoria para los grupos Naïve, cirugía y vehículo + cirugía, no se observaron diferencias antes y después del tratamiento con OXT ($p = 0.929$).

Además, durante la fase oscura la probabilidad de encontrar una diferencia en el tiempo de permanencia en el centro antes y después de la cirugía fue baja en todos los grupos ($p > 0,2$); sin embargo, las ratas que recibieron OXT tendieron a pasar más tiempo en el centro ($p = 0.073$).

8.3.2.2 El efecto de la incisión plantar sobre la distancia total recorrida

Cuando se analiza el impacto del tratamiento con OXT en comparación con los otros grupos, encontramos que después de la incisión plantar (día 1), la distancia total recorrida disminuyó durante la primera hora de la conducta exploratoria y durante las 12 h de la actividad nocturna (Figuras 24B, 24C). Este deterioro se observó a lo largo de los 3 días en el caso de los grupos cirugía y vehículo + cirugía. Por el contrario, en los animales pretratados con OXT, la actividad durante la fase oscura no fue estadísticamente diferente a la del grupo Naïve (Fig. 24C; $p \geq 0.02$). Aunque después de la cirugía se encontró una disminución en la distancia recorrida durante la primera hora de comportamiento exploratorio a lo largo de los 3 días (Fig. 24B; $p \leq 0.008$).

8.3.2.3 El efecto de la incisión plantar sobre la actividad vertical

El número de veces o episodios donde la rata se sostenía en sus patas traseras se vio disminuida por la incisión plantar. Esta reducción significativa en el número de episodios de actividad vertical se observa en la primera hora de comportamiento exploratorio, aunque es durante la fase oscura donde esta reducción es más significativa, sobre todo en los grupos Cirugía y Cirugía + V, donde la cantidad de episodios de levantamiento es significativamente menor ($p < 0.001$) en comparación con el grupo control en los días 1 a 3 posteriores a la cirugía (Fig. 24C y D).

8.3.2.4 La OXT espinal mejora la actividad espontánea

Por el contrario, cuando los animales son administrados con OXT (10 nmol) de manera espinal 10 minutos antes de realizar la incisión plantar, la disminución de su actividad locomotora (distancia total recorrida y actividad vertical, Figs. 24A, 24B, 24C y 24D) es significativamente diferente al control únicamente durante la primera hora de comportamiento exploratorio (principalmente en la distancia total recorrida), pero no durante la fase oscura, donde no es significativamente diferente al control pero si contra los grupos de Cirugía y Cirugía + V ($p < 0.001$), además de que muestra una marcada recuperación, mejorando desde el día 1 y recuperando una actividad similar a la del control al día 3 posterior a la cirugía. Por último, en el caso del tiempo de permanencia en el centro (Fig. 24F, 24G), la probabilidad de que la OXT afectara esta variable en comparación con los animales no tratados quirúrgicamente fue baja en los días de prueba durante la hora exploratoria ($p > 0.2$).

Sin embargo, durante la fase oscura, los animales tratados con OXT tendieron a pasar más tiempo en el centro del equipo de campo abierto, particularmente en los días 1 y 3 posteriores a la cirugía.

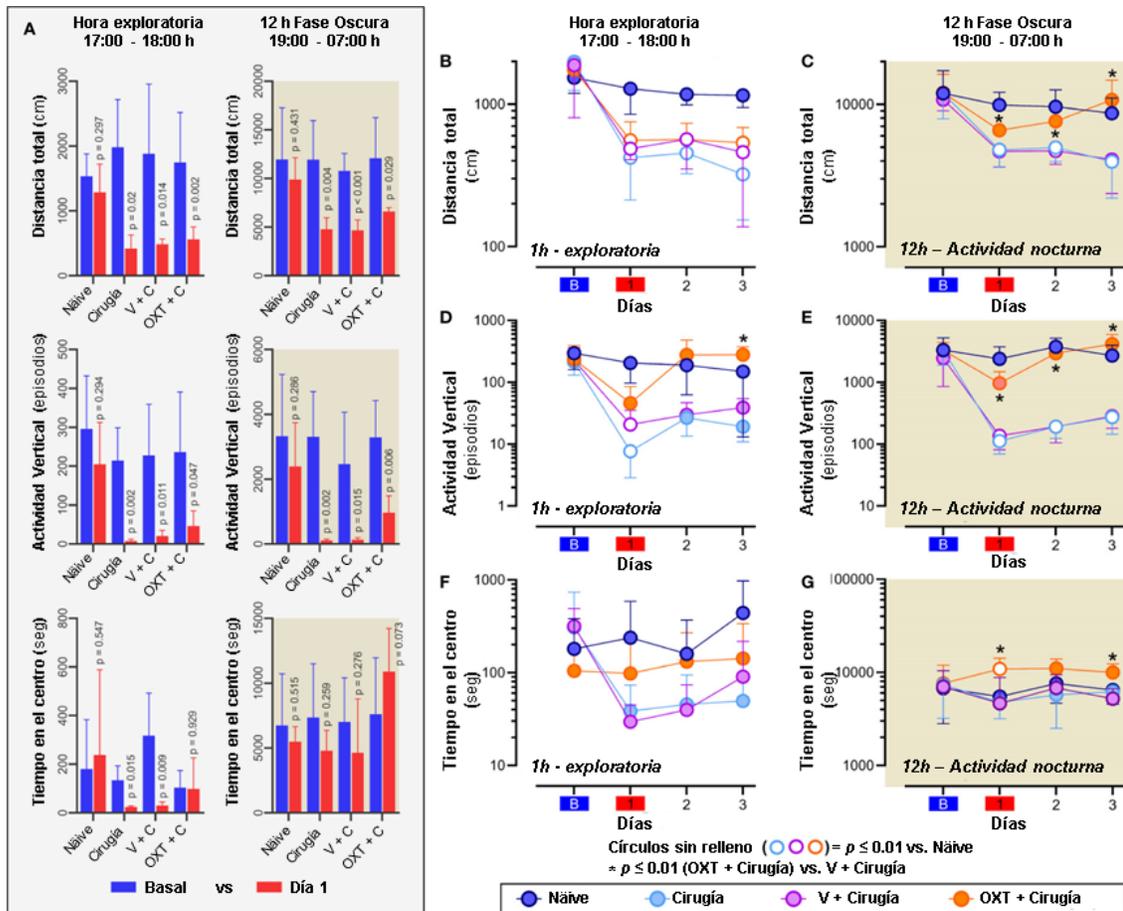


Figura 24. La OXT espinal mejora constantemente el comportamiento espontáneo durante la fase oscura. (A) describe los datos de la conducta espontánea antes (basal) y después de la incisión plantar en los diferentes grupos experimentales; Nótese que la incisión plantar afecta la distancia total recorrida y la actividad vertical en todos los grupos, el tiempo de permanencia en el centro solo se vio afectado durante la hora exploratoria en animales de cirugía y vehículo + cirugía. Los paneles B a G muestran los cambios en la distancia total, la actividad vertical y el tiempo pasado en el centro durante cuatro días en ratas NAÏVE y ratas con: 1) cirugía (círculo azul claro); 2) cirugía+vehículo (V) (círculo magenta); y 3), cirugía+OXT (círculo naranja). En los grupos de cirugía y cirugía+V, la incisión de la pata trasera induce una marcada disminución en la distancia total (B, C) y la actividad de cría vertical (D, E) durante la fase exploratoria y oscura (cuando las ratas son las más activas). Estas disminuciones alcanzan su punto máximo en el día 1 en la hora exploratoria y permanecieron durante los días de prueba posteriores a la cirugía en la fase oscura. Además, aunque no se observó ningún efecto en el grupo de animales a los que se les administró intratecalmente 10 nmol de OXT con respecto a la distancia total durante la hora exploratoria, se indujo una clara mejoría en esta medida en la fase oscura; se obtuvieron resultados similares al medir la actividad vertical. El panel (F) mostró que, aunque se logró una disminución en el tiempo de permanencia en el centro después de la cirugía en todos los animales, no se observó diferencia estática. Sin embargo, como se muestra en el panel (G) se observó un ligero aumento en el tiempo de permanencia en el centro en los animales tratados con OXT. En estos paneles, los círculos sin relleno representan una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre "OXT + cirugía" vs animales "Naïve", mientras que (*) representan una $p < 0.01$ entre "OXT + cirugía" vs "V + cirugía".

9. DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis demuestran que la administración espinal de OXT revierte la nocicepción generada por diversos modelos de dolor persistente. Además de que el efecto de la OXT presenta un efecto antinociceptivo recurrente. Por otro lado, este efecto antinociceptivo podría ser guiado por la activación del receptor a oxitocina (OTR), el cual a través de la activación de diferentes componentes intracelulares reducen la nocicepción en los animales tratados con este neuropéptido. Además, la administración espinal, es capaz de ejercer un efecto preventivo, así como de modificar las conductas espontáneas de los animales sometidos a un modelo de dolor postquirúrgico. Estos datos refuerzan estudios previos que sugieren el potencial uso terapéutico de este neuropéptido en condiciones de dolor tanto agudo como crónico.

9.1 La administración recurrente de OXT inhibe la nocicepción

Bajo nuestras condiciones experimentales y 15 días después de la cirugía SNL, la alodinia táctil medida con los filamentos de von Frey estaba bien establecida (Fig. 12), como reportaron Kim y Chung en 1992 (Kim y Chung, 1992). La estimulación eléctrica del NPV redujo el comportamiento nociceptivo (retirada de pata) repitiendo este efecto si era suministrada una segunda o tercera estimulación, lo que indicaría que dicho efecto puede ser recurrente. Por otra parte, cuando se administró OXT de manera i.t. (1 nmol), ésta alcanzó un valor similar al de la estimulación eléctrica del NPV, lo que podría indicar que el efecto antinociceptivo promovido por la estimulación eléctrica es mediado (en parte) por acción de la OXT, considerando que estudios previos demuestran que la administración del antagonista del OTR bloquean el efecto antinociceptivo de la estimulación eléctrica del NPV (Miranda-Cardenas et al., 2006). Sin embargo, no se puede descartar que la estimulación de este núcleo puede desencadenar la liberación de otros péptidos o inclusive la participación de otros sistemas descendentes.

Este estudio demuestra que la administración i.t. o i.pl. de OXT revierte la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales. En concreto, los resultados del presente estudio demuestran que la administración de OXT espinal o periférica reducen los comportamientos nociceptivos similares a los observados en el dolor neuropático, esto fue probado con los filamentos de von Frey (alodinia), prueba de Hargreaves (hiperalgesia térmica) y prueba de presión de Randall-Selitto (hiperalgesia mecánica). Esta antinocicepción conductual concuerda con los experimentos electrofisiológicos, que muestran que a nivel espinal el tratamiento con OXT disminuye la entrada de señales nociceptivas en ratas con ligadura en nervios (Condés-Lara et al., 2005). Además, estos datos refuerzan estudios previos que sugieren el potencial uso terapéutico de la OXT en condiciones de dolor crónico.

Aunque con los informes anteriores que utilizan enfoques conductuales y electrofisiológicos mostraron que la administración espinal de OXT (~ 1–2 nmol/rata) alivia el dolor neuropático (Condés-Lara et al., 2005, 2006; Miranda-Cardenas et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2007) o el dolor inflamatorio (31µg i.pl.) (González-Hernández et al., 2017), estos estudios fueron diseñados con dosis únicas y no analizan si la administración recurrente de OXT conserva o no su efecto analgésico. En este sentido, en el presente estudio se observó que la administración recurrente de OXT disminuye las respuestas evocadas similares al dolor neuropático (Fig. 13, 14). De manera interesante, también se observó que el umbral de retiro en el día control entre las administraciones i.t. o i.pl. de OXT no presentan un efecto residual, pero que es capaz de recuperar el efecto antihiperálgico si se vuelve a administrar la OXT (Fig. 13, 14).

En este punto, aun cuando los experimentos conductuales sugieren que la administración recurrente de OXT disminuye la nocicepción, tratamos, a través de experimentos electrofisiológicos de analizar el impacto de la administración de la OXT sobre la actividad de neuronas de segundo orden (que reciben aferencias periféricas de fibras Aβ, Aδ y C).

Un hallazgo interesante en los experimentos electrofisiológicos fue el hecho de que encontrar neuronas WDR adecuadas (activadas por estímulos eléctricos periféricos), fue baja en animales cuya ligadura de nervios espinales había ocurrido en un tiempo mayor a 25 días (Fig. 16). Este efecto podría ser el resultado, en parte, de la degeneración Walleriana (Montoya G. et al., 2002; Ye et al., 2015). Sin embargo, cuando se reduce el tiempo entre la ligadura de los nervios espinales y el registro electrofisiológico de 25 a 15 o 17 días posteriores a la ligadura, la posibilidad de encontrar neuronas WDR que responden a estímulos periféricos y la actividad nociceptiva neuronal aumenta. Dicha actividad neuronal de estas neuronas WDR, principalmente la actividad asociada a fibras Aδ y C, puede ser inhibida por la administración de OXT (Fig.17). En este punto, debemos tener en cuenta que utilizamos varias pruebas nociceptivas en el mismo animal para imitar la naturaleza del estímulo multifactorial que puede evocar dolor durante una condición neuropática. Además, utilizando varias pruebas nociceptivas en el mismo animal, evitamos posibles respuestas aprendidas (Deuis et al., 2017). En este sentido, los protocolos experimentales se llevaron a cabo en ese orden para evitar un mayor daño en el animal, iniciando con las pruebas menos estresantes e invasivas para el animal (Gould, 2009).

En particular, nuestros hallazgos sobre la antinocicepción (conductual y electrofisiológica) inducida por la administración de OXT espinal concuerdan con varios estudios que informan que esta administración da como resultado un efecto antinociceptivo en modelos experimentales de dolor neuropático (Condés-Lara et al., 2005, 2012; Miranda-Cardenas et al., 2006; Martínez-Lorenzana et al., 2008; DeLaTorre et al., 2009; Sun et al., 2018; Boada et al., 2019).

Sumado a esto, de manera reciente, se informó que la OXT administrada epiduralmente en humanos es capaz de aliviar el dolor en el transcurso de 6 semanas (Condés-Lara et al., 2016).

Por otra parte, dado que algunos estudios sugieren que la OXT inhibe los nociceptores periféricos (Juif y Poisbeau, 2013; Eliava et al., 2016; González-Hernández et al., 2017), una parte de los experimentos analizaron si la OXT era capaz de ejercer su efecto antinociceptivo cuando se administra por vía periférica. En ese sentido, nuestros resultados muestran que la administración periférica de OXT también indujo antinocicepción en animales con ligadura en los nervios espinales. Esto puede deberse a que los receptores de OXT se expresan en el ganglio de la raíz dorsal de las aferentes primarias, principalmente aquellas fibras de tipo peptidérgico (Martínez-Lorenzana et al., 2008; Moreno-López et al., 2013; Boada et al., 2019). La activación del OTR sobre estas fibras disminuye su frecuencia de disparo, por la disminución de la actividad de los canales presentes en la membrana (i. e. TRPV1) (Nersesyan et al., 2017).

Aunque estos resultados son interesantes y aportan información sobre los efectos de la OXT, el mecanismo a través del cual lleva a cabo este efecto es aún desconocido, es por eso que también se abordó esta incógnita. Para alcanzar este objetivo echamos mano de la prueba de la formalina, la cual al activar diversas modalidades de dolor (nociceptivo, inflamatorio y crónico) nos puede ayudar a ahondar en el o los posibles mecanismos de acción intracelular que desencadena la administración de OXT.

9.2 Posible mecanismo de acción en el efecto antinociceptivo de la OXT

La administración s.c. de 1% de formalina, genera una respuesta nociceptiva (retiro de la pata) producido inmediatamente después de la administración, separado en dos fases (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991), que corresponden una fase nociceptiva o Fase I y una fase inflamatoria o Fase II (Tjølsen et al., 1992; Fischer et al., 2014), así como, de manera tardía, una tercera fase donde se aumenta la sensibilidad ante estímulos táctiles, que es capaz de disminuir el umbral de retiro, siendo está asociada a comportamientos de tipo alodinia e hiperalgesia (Fu et al., 2001; Salinas-Abarca et al., 2017).

Por otra parte, tanto la estimulación eléctrica del NPV como la administración intratecal de una única dosis de OXT (10 nmol) mostraron que pueden prevenir la nocicepción inducida por formalina en ratas, principalmente en la fase II (fase inflamatoria), inclusive este efecto antinociceptivo de la OXT o de la estimulación del NPV es mayor a la de un medicamento antiinflamatorio no esteroideo que normalmente se utiliza en la clínica como lo es el diclofenaco (100 µg/pata trasera ipsilateral s.c.).

Además, por los resultados obtenidos se puede observar que la administración i.t. de OXT o la estimulación del NPV son capaces de prevenir la generación de conductas tipo alodinia, así como recuperar los valores basales 30 días después de su administración (Fig. 18), sugiriendo que la estimulación eléctrica del NPV o la administración i.t. de OXT es capaz de prevenir la sensibilización de las fibras nociceptivas, como se ha demostrado anteriormente (Miranda-Cardenas et al., 2006; DeLaTorre et al., 2009). Aunque se sabe que el efecto antinociceptivo promovido por la estimulación del NPV puede ser bloqueado por la aplicación espinal del antagonista a los receptores de OXT, (sugiriendo que la mayor parte de este efecto es guiado por OXT y la activación de sus receptor) (Miranda-Cardenas et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2010), el o los mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo de este neuropéptido no están del todo claros.

Debido a lo anterior, se decidió evaluar el posible mecanismo del efecto antinociceptivo de la OXT en la prueba de la formalina, para esto se utilizó el antagonista del OTR, el L-368,899 (10 nmol i.t.), que bloqueó el efecto antinociceptivo (tanto temprano como tardío) de la OXT (10 nmol) (Fig. 19). Gracias a estos resultados se puede inferir que el mecanismo antinociceptivo de la OXT parece ser guiado a través de la activación de su receptor OTR. Se decidió no evaluar el efecto del antagonista sobre la antinocicepción generada por la estimulación del NPV, debido a que con esta estimulación no sólo se libera OXT, sino también otros neuropéptidos (Qin et al., 2018) que podrían estar enmascarando o generando un efecto potenciador del efecto antinociceptivo.

Se sabe que el OTR está acoplado principalmente a proteínas de tipo G_q (Gimpl y Fahrenholz, 2001), razón por la cual, canónicamente, su activación incrementa la actividad de la fosfolipasa C (PLC), es por eso que se evaluó la participación de esta proteína; para ello se empleó el inhibidor U-73122 (4 nmol), el cual bloqueó el efecto temprano más no el tardío de la administración i.t. de OXT (Fig. 19), esto sugiere que el efecto antinociceptivo temprano necesita de la activación del OTR y de la participación de la $PLC\beta$.

Se sabe que unos de los principales efectos de la activación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) de tipo G_q (como puede ser el OTR), así como de la activación de la $PLC\beta$ es el incremento del Ca^{2+} intracelular (Ku et al., 1995; Sanborn et al., 1998; Zingg et al., 1998). Este aumento en la concentración de Ca^{2+} puede desencadenar diversas acciones, una de las cuales es la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) con la subsecuente producción de óxido nítrico (NO) (Kuchan y Frangos, 1994; Fleming et al., 1997), cuya activación puede desencadenar la participación de la vía del óxido nítrico/GMP cíclico/canales de potasio sensibles a ATP, que ha demostrado ser una vía antinociceptiva (Cury et al., 2011).

Es por eso que se evaluó la participación de esta vía en el efecto antinociceptivo temprano (principalmente FII), para ello se usaron el inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME (370 nmol), el inhibidor de las guanilato ciclasas ODQ (50 nmol) y el bloqueador de los canales de potasio sensibles a ATP, glibenclamida (100nmol), los cuales también bloquearon el efecto antinociceptivo temprano de la OXT (Fig. 20), lo que indicaría que esta vía participa en dicho efecto. En síntesis la administración de OXT activaría al OTR que al estar acoplado a proteínas del tipo G_q activaría a la $PLC\beta$, con lo cual habría un aumento de Ca^{2+} intracelular que activaría a las NOS, que comenzarían con la producción de NO, este difundiría a través de las membranas (Cury et al., 2011) hasta su órgano diana, las guanilato ciclasas, que a su vez favorecerían la producción de GMP cíclico, que participaría en la apertura de los canales de K^+ sensibles a ATP (Armstead, 1996; Carrier et al., 1997), con la subsecuente hiperpolarización de la membrana debido a la disminución de los impulsos nerviosos de tipo nociceptivo. Ésta vía también fue observada por Gong y col. en experimentos *in vitro* con OXT (Gong et al., 2015).

Por otra parte, también se evaluó otro posible mecanismo de acción antinociceptivo donde estaría involucrada la participación de las proteínas de tipo G_i , debido a que el OTR puede estar acoplado a este tipo de proteínas G, acoplamiento que ha sido demostrado en estudios *in vitro* (Strakova y Soloff, 1997; Gravati et al., 2010; Kumamoto, 2019).

Bajo este razonamiento se evaluó la participación de las proteínas de tipo G_i . Para este objetivo se utilizó un inhibidor de las subunidades $G_{\alpha i}$ como lo es la toxina *pertussis* (PTX; 1 μ g), la cual no fue capaz de bloquear el efecto antinociceptivo temprano de la OXT; sin embargo, la PTX bloqueó el efecto a largo plazo de la administración i.t. de OXT (Fig. 19). También se evaluó la posible participación de las subunidades $G_{\beta/\gamma}$ que también inducen efectos antinociceptivos propios a través de la modulación de canales iónicos (Amaya et al., 2006), o por la activación de vías ERK (Crespo et al., 1994). Para esto se administró galeina, un inhibidor de las subunidades $G_{\beta/\gamma}$ de las proteínas G (137 nmol), la cual no fue capaz de bloquear el efecto antinociceptivo temprano de la OXT, sin embargo, fue capaz de bloquear el efecto a largo plazo de la administración i.t. de OXT, similar a PTX (Fig. 19).

En resumen, Este efecto antinociceptivo tardío sería dependiente de la activación del OTR (el cual también fue bloqueado por L-368,899) que estaría acoplado a proteínas de tipo G_i (demostrado por la administración de PTX), que al activarse promoverían la separación de la subunidad $G_{\alpha i}$ que tendría un efecto negativo sobre la producción de AMPc (Hildebrandt et al., 1983; Sekura et al., 1983), disminuyendo la excitabilidad neuronal. Además, por esta separación de $G_{\alpha i}$, las subunidades $G_{\beta/\gamma}$ (echarían a andar un posible mecanismo antialodínico debido a que el bloqueo de estas subunidades por la galeina impidió el efecto a largo plazo de la OXT).

Este mecanismo guiado por las subunidades $G_{\beta/\gamma}$ podría estar involucrado en la producción de neuroesteroides endógenos, que se ha visto son producidos por la administración de OXT (Juif et al., 2013), esto por vías de activación dependientes de ERK (Juif et al., 2013). Se ha demostrado que G_i puede activar la señalización por vías ERK1/2 mediante mecanismos que involucran las subunidades $\beta\gamma$ disociadas (Crespo et al., 1994; Koch et al., 1994), estas vías que implican la activación de ERK se han observado en varios de receptores acoplados a proteínas G_i (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

En su conjunto estos datos sugieren que la OXT presenta dos mecanismos de acción, uno que involucra la vía del NO/GMPc/ K_{ATP} , y otro que no afectaría en la antinocicepción temprana, pero que tendría un componente a largo plazo que evitaría la aparición de la sensibilización a estímulos táctiles, guiado por el OTR y por la actividad de las subunidades $G_{\alpha i}$ y $G_{\beta/\gamma}$. También estos resultados podrían indicar que la activa distintas vías intracelulares específicas y por lo tanto fármacos con actividad agonista sesgada hacia el OTR pueden ser de interés clínico. Esta suposición se basa en estudios anteriores que mencionan que a la concentración en la que se está empleando la OXT puede desencadenar la activación tanto de vías G_q como G_i (Chini et al., 2017).

En este punto es relevante mencionar que la nocicepción es un proceso complejo que experimentalmente se observa de forma primaria a través de evocar respuestas conductuales o electrofisiológicas; sin embargo, en un proceso donde hay una lesión tisular, la nocicepción puede estar presente a través de la disminución de conductas espontáneas.

Desde esta perspectiva y considerando que la administración i.t. de OXT bloqueaba la nocicepción tardía inducida por formalina, se sugiere la posibilidad de que este neuropéptido tenga efectos antinociceptivos preventivos. Para tratar de contestar esta pregunta, se determinó el efecto de la administración i.t. de OXT en un modelo de dolor postquirúrgico, evaluando conductas tanto evocadas como espontáneas.

9.3 Efecto de la administración de la OXT en las conductas evocadas y espontáneas posteriores a una intervención quirúrgica

Este estudio mostró que el pretratamiento con OXT espinal induce no sólo una disminución de la hipersensibilidad mecánica evocada (Fig. 21) sino también una mejora de la actividad espontánea en un modelo de dolor postoperatorio (Fig. 22, 23). Estos datos podrían apoyar la afirmación de que la OXT podría tener un efecto potencial como fármaco analgésico preventivo.

Además, a pesar de los estudios sobre el efecto antinociceptivo de la OXT espinal, con perspectivas que van desde el dolor neuropático al inflamatorio y desde los estudios conductuales a los electrofisiológicos (Poisbeau et al., 2018), que arrojan resultados específicos hacia características únicas de cada tipo de dolor, haciéndolos no intercambiables (Woolf, 2010; Deuis et al., 2017). Sin embargo, se debe puntualizar que no se ha realizado ningún estudio para evaluar el efecto de la OXT utilizando un modelo de dolor postquirúrgico, el cual implica lesión del tejido periférico, proceso inflamatorio y lesión de nervios aislados; de ahí que el dolor inducido por la cirugía se considere una entidad diferente de otros tipos de dolor (Apfelbaum et al., 2003; Brennan, 2011; Reddi, 2016).

Como se demostró previamente (Brennan et al., 1996; Pogatzki et al., 2002; Pogatzki y Raja, 2003), la incisión de la pata tiene un efecto considerable sobre la hipersensibilidad mecánica evocada, este es un efecto asociado con la sensibilización de las células del asta dorsal de la médula espinal en respuesta a la actividad espontánea de las fibras A δ y C (Vandermeulen y Brennan, 2000; Hämäläinen et al., 2002). De hecho, la alodinia hacia los estímulos mecánicos ocurre después de la incisión plantar, pero en los animales tratados previamente con OXT, el impacto en el umbral de retiro después de la cirugía fue menor, lo que sugiere un posible efecto analgésico preventivo.

Específicamente, el umbral de retiro de los animales pretratados con OXT no fue estadísticamente diferente ($p = 0.1$) a su valor basal después de cuatro días, mientras que el valor umbral de los animales no tratados no fue estadísticamente diferente hasta el día 6 después de la cirugía, lo que sugiere que además del efecto protector observado en el día 1, la OXT también disminuye el tiempo de recuperación (Fig. 21).

Estos datos concuerdan con un reporte previo que muestra que la OXT espinal previene la LTP espinal en un modelo electrofisiológico (DeLaTorre et al., 2009), uno de los mecanismos por los cuales el dolor agudo (en este caso, la incisión cutánea) induce una sensibilización central y, en consecuencia, una hipersensibilidad a largo plazo (Ruscheweyh et al., 2011; Woolf, 2011). Debemos mencionar que la LTP espinal se midió como un aumento en la actividad de las fibras A δ y C nociceptivas. Por lo tanto, los datos electrofisiológicos sobre el efecto antinociceptivo preventivo de la OXT pueden correlacionar con los experimentos conductuales que midieron la hipersensibilidad mecánica. La hipersensibilidad que se puede generar posterior a una intervención quirúrgica podría ser la principal fuente de dolor evocado (Jensen y Finnerup, 2009), es por eso que se decidió evaluar a través de los filamentos de von Frey.

No obstante, aunque las pruebas nociceptivas evocadas son útiles para evaluar posibles fármacos analgésicos, la medición de la conducta espontánea es fundamental porque proporciona información sobre el proceso del dolor en condiciones "normales" (Matson et al., 2007; Gould, 2009; Urban et al., 2011; Cho et al., 2013; Majuta et al., 2017b, 2017a). En humanos, el dolor espontáneo puede cuantificarse preguntándoles ya sea a pacientes o al personal de salud que está en contacto con estos pacientes (Gaston-Johansson y Gustafsson, 1990; Gaston-Johansson et al., 1990; Norvell et al., 1990), mientras que en roedores la evaluación de la actividad locomotora puede utilizarse como un modelo que emule estos resultados (Roughan et al., 2009; Majuta et al., 2018). Además, los estudios conductuales de dolor evocados por estímulos clásicos (presión, temperatura o tacto) se realizan principalmente durante el día y no durante la noche que es cuando los roedores presentan una mayor actividad (Yasenkov y Deboer, 2012; Frank et al., 2017).

Bajo esta premisa, mediante un sistema automatizado, se midió la actividad locomotora en tiempo real durante 16 horas, de 17:00 a 09:00 horas (horario que incluye el momento del día en que las ratas son más activas). Cuando los animales se colocaron en las cajas de actividad durante la fase de luz (17:00 horas), exploraron activamente el nuevo entorno durante aproximadamente 1 hora. Después de la exploración inicial, la mayoría de los animales permanecieron en reposo o redujeron notablemente su actividad hasta el comienzo de la fase de oscuridad (19:00 horas). En este punto, los animales mostraron un aumento significativo de la actividad locomotora durante las horas nocturnas (19:00–07:00 horas) que disminuyó una vez que se volvió a encender la luz de la habitación (07:00 horas) (Fig. 22 y 23).

El aumento de la actividad durante el día (17:00 - 18:00 horas) es consistente con la conducta exploratoria en busca de posibles amenazas dentro de un nuevo entorno (Seibenhener y Wooten, 2015), mientras que el aumento de la actividad inmediatamente después de que la habitación se oscureció (19:00 – 7:00 horas) es consistente con la actividad relacionada con beber, anidar y explorar el entorno para buscar comida (Frank et al., 2017).

De hecho, las observaciones y estudios de varios grupos de investigación demuestran que la actividad espontánea se reduce cuando hay una lesión en el cuerpo (Yehuda et al., 1986; Imanaka et al., 2008; Parent et al., 2012; Majuta et al., 2017b).

Este tipo de evaluación arroja un tipo de información que no se ve comúnmente en otros estudios, ya que permite evaluar el malestar general ocasionado por un daño, así como la observación de los posibles cambios conductuales en el ritmo cotidiano del día a día, como sería en tratamiento farmacológico en humanos.

En este sentido, nuestros datos utilizando el comportamiento espontáneo mostraron que la incisión plantar disminuye el comportamiento espontáneo. Como se informó anteriormente (Brennan et al., 1996; Pogatzki et al., 2002; Pogatzki y Raja, 2003), la distancia total recorrida y la actividad vertical se redujeron después de la incisión de la pata en animales tratados y no tratados.

Sin embargo, cuando comparamos el efecto de los tratamientos en los 3 días posteriores a la cirugía, se observa que la OXT mejoró claramente las variables antes mencionadas, particularmente durante la fase oscura. En su conjunto, estos datos apoyan nuestra afirmación de que este neuropéptido podría tener propiedades analgésicas preventivas, probablemente por la interrupción de la sensibilización central (DeLaTorre et al., 2009; Ruscheweyh et al., 2011; Woolf, 2011) provocada por la incisión plantar.

Además, por lo observado en estudios anteriores los animales podrían desarrollar conductas similares a la ansiedad después de la incisión plantar (Kouya et al., 2015). De hecho, cuando se analiza el tiempo que permanecen los animales en el centro de la caja antes y después de la cirugía (Fig. 23). Se observa que: (i) los animales no tratados pasaron menos tiempo ($p \leq 0.015$) en el centro de la caja, (ii) en contraste con los animales tratados con OXT ($p = 0.929$). Sin embargo, cuando comparamos el efecto de los tratamientos durante los 3 días posteriores a la cirugía, observamos un aumento en el tiempo de permanencia ($p \leq 0.01$) en el centro durante la fase oscura en los animales tratados con OXT. En conjunto, estos datos sugieren que la OXT administrada de manera intratecal parece inducir efectos ansiolíticos.

Este efecto ansiolítico de la OXT fue observado en estudios anteriores, donde la administración de OXT en el NPV, promueve la participación de los canales TRPV2 aumentando el Ca^{2+} intracelular, reclutando vías ERK1/2, promoviendo la liberación de OXT por parte de las neuronas parvocelulares que proyectan a la amígdala (Blume et al., 2008; Jurek et al., 2012; van den Burg et al., 2015; Yao et al., 2017).

Sin embargo, esto fue cuando se administraba a niveles supraespinales (Ring et al., 2006; Neumann y Slattery, 2016). Por lo tanto, queda la pregunta ¿Cómo la administración de OXT intratecal induce efectos ansiolíticos? Esto podría deberse a que la OXT administrada de manera intratecal podría alcanzar niveles supraespinales utilizando la dinámica del líquido cefalorraquídeo, ejerciendo así sus efectos ansiolíticos, pero se requieren más estudios que puedan explicar este efecto.

10. CONCLUSIÓN

La administración de OXT disminuye la nocicepción evocada en diversos modelos de dolor persistente. En la primera parte experimental se demuestra que la administración de OXT (central o periférica) presenta una recurrencia en el efecto antinociceptivo, probablemente a través de la inhibición de la actividad de las aferentes primarias nociceptivas.

Por otra parte, indagando en los posibles mecanismos que se activan por la administración de OXT, los datos en la prueba de la formalina muestran que la administración espinal de OXT, desencadena dos posibles mecanismos de acción: (i) de forma temprana por la activación del receptor OTR y de la vía PLC/NO/GMPc/canales de K⁺ sensibles a ATP, y (ii) de manera tardía, por la activación del OTR y las vías dependientes de las subunidades G_α y G_{βγ}. Por lo cual, la OXT activa sesgadamente dos mecanismos intracelulares dependientes de un mismo receptor (Kenakin, 2009; Michel y Charlton, 2018).

Finalmente, la administración espinal de OXT favorece las conductas espontáneas a través de un posible mecanismo protector, en un modelo de dolor postquirúrgico, lo que sugiere que la OXT podría ser utilizada como un analgésico preventivo en la clínica.

REFERENCIAS

- Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji R-R, Tanaka M (2006) Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain* 124:175–183.
- Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan y TJ (2003) Postoperative Pain Experience: Results from a National Survey Suggest Postoperative Pain Continues to Be Undermanaged: *Anesthesia & Analgesia* 97:534–540.
- Araldi D, Ferrari LF, Levine JD (2015) Repeated Mu-Opioid Exposure Induces a Novel Form of the Hyperalgesic Priming Model for Transition to Chronic Pain. *J Neurosci* 35:12502–12517.
- Arletti R, Benelli A, Bertolini A (1993) Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides* 24:125–129.
- Armstead WM (1996) Role of ATP-sensitive K⁺ channels in cGMP-mediated pial artery vasodilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 270:H423–H426.
- Attal N (2001) Pharmacologic treatment of neuropathic pain. *Acta Neurol Belg* 101:53–64.
- Barnes NM, Hales TG, Lummis SCR, Peters JA (2009) The 5-HT₃ receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56:273–284.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2016) *Neuroscience: exploring the brain*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Belkouch M, Dansereau M-A, Réaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Beaudet N, Chraïbi A, Melik-Parsadaniantz S, Sarret P (2011) The Chemokine CCL2 Increases Nav1.8 Sodium Channel Activity in Primary Sensory Neurons through a Gβγ-Dependent Mechanism. *J Neurosci* 31:18381–18390.
- Blume A, Bosch OJ, Miklos S, Torner L, Wales L, Waldherr M, Neumann ID (2008) Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *European Journal of Neuroscience* 27:1947–1956.
- Boada MD, Gutierrez S, Eisenach JC (2019) Peripheral oxytocin restores light touch and nociceptor sensory afferents towards normal after nerve injury. *Pain* 160:1146–1155.
- Brennan TJ (2011) Pathophysiology of postoperative pain. *Pain* 152:S33-40.

- Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF (1996) Characterization of a rat model of incisional pain: *Pain* 64:493–502.
- Caraceni A, Zecca E, Martini C, De Conno F (1999) Gabapentin as an adjuvant to opioid analgesia for neuropathic cancer pain. *J Pain Symptom Manage* 17:441–445.
- Carrier GO, Fuchs LC, Winecoff AP, Giulumian AD, White RE (1997) Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am J Physiol* 273:H76-84.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53:55–63.
- Chapman V, Suzuki R, Chamarette HL, Rygh LJ, Dickenson AH (1998) Effects of systemic carbamazepine and gabapentin on spinal neuronal responses in spinal nerve ligated rats. *Pain* 75:261–272.
- Chini B, Verhage M, Grinevich V (2017) The Action Radius of Oxytocin Release in the Mammalian CNS: From Single Vesicles to Behavior. *Trends in Pharmacological Sciences* 38:982–991.
- Cho H, Jang Y, Lee B, Chun H, Jung J, Kim SM, Hwang SW, Oh U (2013) Voluntary Movements as a Possible Non-Reflexive Pain Assay. *Mol Pain* 9:1744-8069-9–25.
- Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59:369–376.
- Chung JM, Chung K (2007) Neuropathic Pain Model, Spinal Nerve Ligation Model. In: *Encyclopedia of Pain* (Schmidt RF, Willis WD, eds), pp 1303–1306. Berlin, Heidelberg: Springer. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-29805-2_2683 [Accessed October 1, 2021].
- Cingolani HE, Houssay AB (2000) *Fisiologia humana de Houssay/ Human Physiology of Houssay*, 7th ed. Buenos Aires: El Ateneo.
- Clark AK, Old EA, Malcangio M (2013) Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res* 6:803–814.
- Coggeshall RE, Lekan HA, Doubell TP, Allchorne A, Woolf CJ (1997) Central changes in primary afferent fibers following peripheral nerve lesions. *Neuroscience* 77:1115–1122.
- Condés-Lara M, González NM, Martínez-Lorenzana G, Delgado OL, Freund-Mercier MJ (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 IAS, Dickenson AH (2005) Oxytocin actions on afferent evoked spinal cord neuronal activities in neuropathic but not in normal rats. *Brain Res* 1045:124–133.
- 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.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Diez-Martínez DC, 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, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, López-Hidalgo M, Rodríguez-Jiménez J (2009) Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells. *Brain Res* 1247:38–49.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López Hidalgo M, Freund-Mercier MJ (2006) Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res* 1081:126–137.
- 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* 22:532–534.
- Cowie AM, Stucky CL (2019) A Mouse Model of Postoperative Pain. *Bio Protoc* 9:e3140.
- Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369:418–420.
- Crock LW, Kolber BJ, Morgan CD, Sadler KE, Vogt SK, Bruchas MR, Gereau RW (2012) Central amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in the modulation of visceral pain. *J Neurosci* 32:14217–14226.
- Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25:243–254.
- Dalmolin GD, Bannister K, Gonçalves L, Sikandar S, Patel R, Cordeiro M do N, Gomez MV, Ferreira J, Dickenson AH (2017) Effect of the spider toxin Tx3-3 on spinal processing of sensory information in naive and neuropathic rats: an in vivo electrophysiological study. *Pain Rep* 2:e610.
- de Araujo AD, Mobli M, Castro J, Harrington AM, Vetter I, Dekan Z, Muttenthaler M, Wan J, Lewis RJ, King GF, Brierley SM, Alewood PF (2014) Selenoether oxytocin

analogues have analgesic properties in a mouse model of chronic abdominal pain. *Nat Commun* 5:3165.

- De Kloet ER, Voorhuis ThAM, Elands J (1985) Estradiol induces oxytocin binding sites in rat hypothalamic ventromedial nucleus. *European Journal of Pharmacology* 118:185–186.
- de los Monteros-Zuñiga AE, Izquierdo T, Quiñonez-Bastidas GN, Rocha-González HI, Godínez-Chaparro B (2016) Anti-allodynic effect of mangiferin in neuropathic rats: Involvement of nitric oxide-cyclic GMP-ATP sensitive K⁺ channels pathway and serotonergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 150–151:190–197.
- 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.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549–563.
- Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I (2017) Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* 10:284.
- Dirig DM, Salami A, Rathbun ML, Ozaki GT, Yaksh TL (1997) Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods* 76:183–191.
- Dixon WJ (1965) The Up-and-Down Method for Small Samples. *Journal of the American Statistical Association* 60:967–978.
- Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441–462.
- Dubuisson D, Dennis SG (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161–174.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice ASC, Stacey BR, Treede R-D, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132:237–251.
- Eckhardt K, Ammon S, Hofmann U, Riebe A, Gugeler N, Mikus G (2000) Gabapentin enhances the analgesic effect of morphine in healthy volunteers. *Anesth Analg* 91:185–191.

- Eliava M et al. (2016) A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* 89:1291–1304.
- Espinosa De Los Monteros-Zúñiga A, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A (2020) Intrathecal Oxytocin Improves Spontaneous Behavior and Reduces Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Postoperative Pain. *Front Pharmacol* 11:581544.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118:289–305.
- Fischer M, Carli G, Raboisson P, Reeh P (2014) The interphase of the formalin test: *Pain* 155:511–521.
- Fleming I, Bauersachs J, Busse R (1997) Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res* 34:165–174.
- Flórez J, Armijo JA, Mediavilla Á (1998) *Farmacología humana*. Barcelona: Masson.
- Francken BJ, Josson K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WH, Leysen JE (2000) Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Mol Pharmacol* 57:1034–1044.
- Frank MG, Ruby NF, Heller HC, Franken P (2017) Development of Circadian Sleep Regulation in the Rat: A Longitudinal Study Under Constant Conditions. *Sleep* 40.
- Fu K-Y, Light AR, Maixner W (2001) Long-Lasting Inflammation and Long-Term Hyperalgesia After Subcutaneous Formalin Injection Into the Rat Hindpaw. *The Journal of Pain* 2:2–11.
- G A, S P, P M, A LB (1995) Desensitization of oxytocin receptors in cultured human myometrial cells. *Adv Exp Med Biol* 395:481–482.
- Gao L, Yu L-C (2004) Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats. *Regul Pept* 120:53–58.
- Gao Y-J, Ji R-R (2010) Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 7:482–493.
- Gaston-Johansson F, Albert M, Fagan E, Zimmerman L (1990) Similarities in pain descriptions of four different ethnic-culture groups. *J Pain Symptom Manage* 5:94–100.
- Gaston-Johansson F, Gustafsson M (1990) Rheumatoid arthritis: determination of pain characteristics and comparison of RAI and VAS in its measurement. *Pain* 41:35–40.

- 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* 927:204–207.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiological Reviews* 81:629–683.
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26:3122–3142.
- Gomezese Ribero Ó, Ribero ÓFG, Olaya HLG (2010) Dolor: una mirada introductoria. *MedUNAB* 4.
- Gong L, Gao F, Li J, Li J, Yu X, Ma X, Zheng W, Cui S, Liu K, Zhang M, Kunze W, Liu CY (2015) Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca²⁺/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience* 289:417–428.
- González-Hernández A, Manzano-García A, Martínez-Lorenzana G, Tello-García IA, 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.
- Gorczyca R, Filip R, Walczak E (2013) Psychological Aspects of Pain. *Ann Agric Environ Med* 20:23–27.
- Gould TD ed. (2009) Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests. New York, NY: Humana Press.
- Gravati M, Busnelli M, Bulgheroni E, Reversi A, Spaiardi P, Parenti M, Toselli M, Chini B (2010) Dual modulation of inward rectifier potassium currents in olfactory neuronal cells by promiscuous G protein coupling of the oxytocin receptor. *J Neurochem* 114:1424–1435.
- Gu X-L, Yu L-C (2007) Involvement of opioid receptors in oxytocin-induced antinociception in the nucleus accumbens of rats. *J Pain* 8:85–90.
- Guerrero-Alba R, Barragán-Iglesias P, González-Hernández A, Valdez-Moráles EE, Granados-Soto V, Condés-Lara M, Rodríguez MG, Marichal-Cancino BA (2018) Some Prospective Alternatives for Treating Pain: The Endocannabinoid System and Its Putative Receptors GPR18 and GPR55. *Front Pharmacol* 9:1496.
- Hämäläinen MM, Gebhart GF, Brennan TJ (2002) Acute effect of an incision on mechanosensitive afferents in the plantar rat hindpaw. *J Neurophysiol* 87:712–720.
- Han Y, Yu L-C (2009) Involvement of oxytocin and its receptor in nociceptive modulation in the central nucleus of amygdala of rats. *Neurosci Lett* 454:101–104.

- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88.
- Hernandez A, Soto-Moyano R, Mestre C, Eschaliere A, Pelissier T, Paeille C, Contreras E (1995) Intrathecal Pertussis Toxin but not Cyclic AMP Blocks Kappa Opioid-Induced Antinociception in rat. *International Journal of Neuroscience* 81:193–197.
- Hildebrandt JD, Sekura RD, Codina J, Iyengar R, Manclark CR, Birnbaumer L (1983) Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* 302:706–709.
- Hyland NP, Cryan JF (2010) A Gut Feeling about GABA: Focus on GABA(B) Receptors. *Front Pharmacol* 1:124.
- Imanaka A, Morinobu S, Toki S, Yamamoto S, Matsuki A, Kozuru T, Yamawaki S (2008) Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague–Dawley rats. *Behavioural Brain Research* 186:91–97.
- Insel TR, Shapiro LE (1992) Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *PNAS* 89:5981–5985.
- Izquierdo T, Espinosa de los Monteros-Zuñiga A, Cervantes-Durán C, Lozada MC, Godínez-Chaparro B (2013) Mechanisms underlying the antinociceptive effect of mangiferin in the formalin test. *European Journal of Pharmacology* 718:393–400.
- Jaggi AS, Jain V, Singh N (2011) Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 25:1–28.
- Jensen TS, Finnerup NB (2009) Neuropathic pain treatment: a further step forward. *Lancet* 374:1218–1219.
- Ji RR, Woolf CJ (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 8:1–10.
- Jo YH, Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ, Schlichter R (1998) Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci* 18:2377–2386.
- Juif P-E, Breton J-D, Rajalu M, Charlet A, Goumon Y, Poisbeau P (2013) Long-Lasting Spinal Oxytocin Analgesia Is Ensured by the Stimulation of Allopregnanolone Synthesis Which Potentiates GABAA Receptor-Mediated Synaptic Inhibition. *Journal of Neuroscience* 33:16617–16626.
- 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.

- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203–210.
- Jurek B, Slattery DA, Maloumby R, Hillerer K, Koszinowski S, Neumann ID, Burg EH van den (2012) Differential Contribution of Hypothalamic MAPK Activity to Anxiety-Like Behaviour in Virgin and Lactating Rats. *PLOS ONE* 7:e37060.
- Kandel E, Schwartz J (2013) *Principles of Neural Science*, 5th ed. New York, NY: McGraw Hill Professional.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ (2014) *Princípios de Neurociências - 5.ed.* AMGH Editora.
- Kenakin T (2009) Biased agonism. *F1000 Biol Rep* 1:87.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355–363.
- Kinnman E, Levine JD (1995) Sensory and sympathetic contributions to nerve injury-induced sensory abnormalities in the rat. *Neuroscience* 64:751–767.
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12706–12710.
- Kohama I, Ishikawa K, Kocsis JD (2000) Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. *J Neurosci* 20:1538–1549.
- Komori N, Takemori N, Kim HK, Singh A, Hwang S-H, Foreman RD, Chung K, Chung JM, Matsumoto H (2007) Proteomics study of neuropathic and nonneuropathic dorsal root ganglia: altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury. *Physiol Genomics* 29:215–230.
- Kouya F, Iqbal Z, Charen D, Shah M, Banik RK (2015) Evaluation of anxiety-like behaviour in a rat model of acute postoperative pain. *Eur J Anaesthesiol* 32:242–247.
- Ku CY, Qian A, Wen Y, Anwer K, Sanborn BM (1995) Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase-C activities via coupling to G alpha q/11. *Endocrinology* 136:1509–1515.
- Kuchan MJ, Frangos JA (1994) Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol* 266:C628-636.
- Kumamoto E (2019) Cellular Mechanisms for Antinociception Produced by Oxytocin and Orexins in the Rat Spinal Lamina II—Comparison with Those of Other Endogenous Pain Modulators. *Pharmaceuticals* 12:136.

- Kumar N (2007) WHO Normative Guidelines on Pain Management. Geneva: World Health Organization.
- LaBuda CJ, Little PJ (2005) Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J Neurosci Methods* 144:175–181.
- Le Bars D, Cadden SW (2008) 5.25 - What is a Wide-Dynamic-Range Cell? In: *The Senses: A Comprehensive Reference* (Masland RH, Albright TD, Albright TD, Masland RH, Dallos P, Oertel D, Firestein S, Beauchamp GK, Catherine Bushnell M, Basbaum AI, Kaas JH, Gardner EP, eds), pp 331–338. New York: Academic Press. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123708809001675> [Accessed May 30, 2021].
- Leem JW, Willis WD, Chung JM (1993) Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *J Neurophysiol* 69:1684–1699.
- Lehmann DM, Seneviratne AMPB, Smrcka AV (2008) Small Molecule Disruption of G Protein $\beta\gamma$ Subunit Signaling Inhibits Neutrophil Chemotaxis and Inflammation. *Mol Pharmacol* 73:410–418.
- Li Z, He SQ, Tseng PY, Xu Q, Tiwari V, Yang F, Shu B, Zhang T, Tang Z, Raja SN, Wang Y, Dong X, Guan Y (2015) The inhibition of high-voltage-activated calcium current by activation of MrgC11 involves phospholipase C-dependent mechanisms. *Neuroscience* 300:393–403.
- Lin C-S, Tsaur M-L, Chen C-C, Wang T-Y, Lin C-F, Lai Y-L, Hsu T-C, Pan Y-Y, Yang C-H, Cheng J-K (2007) Chronic intrathecal infusion of minocycline prevents the development of spinal-nerve ligation-induced pain in rats. *Reg Anesth Pain Med* 32:209–216.
- Lobban MD, Irons LI, van Heyningen S (1991) Binding of NAD⁺ to pertussis toxin. *Biochim Biophys Acta* 1078:155–160.
- Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Pizzolato G, Dreifuss JJ (1989) Localization of oxytocin binding sites in the human brainstem and upper spinal cord: an autoradiographic study. *Brain Res* 500:223–230.
- Lundeberg T, Meister B, Björkstrand E, Uvnäs-Moberg K (1993) Oxytocin modulates the effects of galanin in carrageenan-induced hyperalgesia in rats. *Brain Res* 608:181–185.
- Macdonald K, Macdonald TM (2010) The peptide that binds: a systematic review of oxytocin and its prosocial effects in humans. *Harv Rev Psychiatry* 18:1–21.
- Madrazo I, Franco-Bourland RE, León-Meza VM, Mena I (1987) Intraventricular somatostatin-14, arginine vasopressin, and oxytocin: analgesic effect in a patient with intractable cancer pain. *Appl Neurophysiol* 50:427–431.

- Majuta LA, Guedon J-MG, Mitchell SAT, Kuskowski MA, Mantyh PW (2017a) Mice with cancer-induced bone pain show a marked decline in day/night activity: *PAIN Reports* 2:e614.
- Majuta LA, Guedon J-MG, Mitchell SAT, Ossipov MH, Mantyh PW (2017b) Anti-nerve growth factor therapy increases spontaneous day/night activity in mice with orthopedic surgery-induced pain: *PAIN* 158:605–617.
- Majuta LA, Mitchell SAT, Kuskowski MA, Mantyh PW (2018) Anti-nerve growth factor does not change physical activity in normal young or aging mice but does increase activity in mice with skeletal pain: *PAIN* 159:2285–2295.
- 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* 140:265–273.
- Mas CS, Blanch GG (2007) Sistema sensorial y motor. Control motor. In: *Fundamentos de neurociencia*, 1st ed., pp 149–180. Barcelona: Editorial UOC.
- Matson DJ, Broom DC, Carson SR, Baldassari J, Kehne J, Cortright DN (2007) Inflammation-Induced Reduction of Spontaneous Activity by Adjuvant: A Novel Model to Study the Effect of Analgesics in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 320:194–201.
- Mazzuca M, Minlebaev M, Shakirzyanova A, Tyzio R, Taccola G, Janackova S, Gataullina S, Ben-Ari Y, Giniatullin R, Khazipov R (2011) Newborn Analgesia Mediated by Oxytocin during Delivery. *Front Cell Neurosci* 5:3.
- Merskey H (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6:249.
- Mestre C, Péliissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 32:197–200.
- Michel MC, Charlton SJ (2018) Biased Agonism in Drug Discovery—Is It Too Soon to Choose a Path? *Mol Pharmacol* 93:259–265.
- Millan MJ (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 MJ, 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.

- Mixcoatl-Zecuatl T, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V (2006) The nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channel pathway participates in the antiallodynic effect of spinal gabapentin. *Eur J Pharmacol* 531:87–95.
- Mixcoatl-Zecuatl T, Medina-Santillán R, Reyes-García G, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V (2004) Effect of K⁺ channel modulators on the antiallodynic effect of gabapentin. *Eur J Pharmacol* 484:201–208.
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10:283–294.
- Montoya G JV, Ariza J, Sutachán JJ, Hurtado H (2002) Relationship between functional deficiencies and the contribution of myelin nerve fibers derived from L-4, L-5, and L-6 spinolumbar branches in adult rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 173:266–274.
- Moon DE, Lee DH, Han HC, Xie J, Coggeshall RE, Chung JM (1999) Adrenergic sensitivity of the sensory receptors modulating mechanical allodynia in a rat neuropathic pain model. *Pain* 80:589–595.
- 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.
- Nakagawa T, Kaneko S (2010) Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J Pharmacol Sci* 114:347–353.
- Narita M, Ohsawa M, Mizoguchi H, Aoki T, Suzuki T, Tseng LF (2000) Role of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C pathway in delta-opioid receptor-mediated antinociception in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 99:327–331.
- Nersesyan Y, Demirkhanyan L, Cabezas-Bratesco D, Oakes V, Kusuda R, Dawson T, Sun X, Cao C, Cohen AM, Chelluboina B, Veeravalli KK, Zimmermann K, Domene C, Brauchi S, Zakharian E (2017) Oxytocin Modulates Nociception as an Agonist of Pain-Sensing TRPV1. *Cell Rep* 21:1681–1691.
- Neumann ID, Slattery DA (2016) Oxytocin in General Anxiety and Social Fear: A Translational Approach. *Biological Psychiatry* 79:213–221.
- Norvell KT, Gaston-Johansson F, Zimmerman L (1990) Pain description by nurses and physicians. *J Pain Symptom Manage* 5:11–17.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem* 276:19452–19460.
- O'Connor AB, Dworkin RH (2009) Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am J Med* 122:S22-32.

- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779–3787.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58:389–462.
- Pacher P, Mechoulam R (2011) Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res* 50:193–211.
- Parent AJ, Beaudet N, Beaudry H, Bergeron J, Bérubé P, Drolet G, Sarret P, Gendron L (2012) Increased Anxiety-Like Behaviors in Rats Experiencing Chronic Inflammatory Pain. *Behav Brain Res* 229:160–167.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6 th. Amsterdam; Boston: Elsevier.
- Petersson M, Wiberg U, Lundeberg T, Uvnäs-Moberg K (2001) Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides* 22:1479–1484.
- Phaneuf S, Asbóth G, Carrasco MP, Europe-Finner GN, Saji F, Kimura T, Harris A, Bernal AL (1997) The desensitization of oxytocin receptors in human myometrial cells is accompanied by down-regulation of oxytocin receptor messenger RNA. *Journal of Endocrinology* 154:7–18.
- Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ (2002) Characterization of A δ - and C-Fibers Innervating the Plantar Rat Hindpaw One Day After an Incision. *Journal of Neurophysiology* 87:721–731.
- Pogatzki EM, Raja SN (2003) A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 99:1023–1027.
- Poisbeau P, Grinevich V, Charlet A (2018) Oxytocin Signaling in Pain: Cellular, Circuit, System, and Behavioral Levels. *Curr Top Behav Neurosci* 35:193–211.
- Portenoy RK (2000) Current pharmacotherapy of chronic pain. *J Pain Symptom Manage* 19:S16-20.
- Qian A, Wang W, Sanborn BM (1998) Evidence for the Involvement of Several Intracellular Domains in the Coupling of Oxytocin Receptor to G α q/11. *Cellular Signalling* 10:101–105.
- Qin C, Li J, Tang K (2018) The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* 159:3458–3472.
- Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111:409–419.
- Reddi D (2016) Preventing chronic postoperative pain. *Anaesthesia* 71 Suppl 1:64–71.

- Ring RH, Malberg JE, Potestio L, Ping J, Boikess S, Luo B, Schechter LE, Rizzo S, Rahman Z, Rosenzweig-Lipson S (2006) Anxiolytic-like activity of oxytocin in male mice: behavioral and autonomic evidence, therapeutic implications. *Psychopharmacology* 185:218–225.
- Robinson DA, Wei F, Wang GD, Li P, Kim SJ, Vogt SK, Muglia LJ, Zhuo M (2002) Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol (Lond)* 540:593–606.
- Robleda G, Sillero-Sillero A, Puig T, Gich I, Baños J-E (2014) Influence of preoperative emotional state on postoperative pain following orthopedic and trauma surgery. *Rev Lat Am Enfermagem* 22:785–791.
- Rocha-González HI, Argüelles, C, Granados-Soto V (2009) Role of Serotonin Receptors in Inflammatory Pain. In: *Acute Pain: Causes, Effects and Treatment*, pp 1–74. S.D.A.y.K.L. Grasso.
- Rojas-Piloni G, Gerardo R-P, Mejía-Rodríguez R, Rosalinda M-R, Martínez-Lorenzana G, Guadalupe M-L, Condés-Lara M, Miguel C-L (2010) Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 476:32–35.
- 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, 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.
- Roughan JV, Wright-Williams SL, Flecknell PA (2009) Automated analysis of postoperative behaviour: assessment of HomeCageScan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice. *Lab Anim* 43:17–26.
- Ruscheweyh R, Wilder-Smith O, Drdla R, Liu X-G, Sandkühler J (2011) Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain* 7:20.
- Russo R, D'Agostino G, Mattace Raso G, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A (2012) Central administration of oxytocin reduces hyperalgesia in mice: Implication for cannabinoid and opioid systems. *Peptides* 38:81–88.
- Salinas-Abarca AB, Avila-Rojas SH, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Granados-Soto V (2017) Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 797:83–93.
- Sanborn BM, Dodge K, Monga M, Qian A, Wang W, Yue C (1998) Molecular Mechanisms Regulating the Effects of Oxytocin on Myometrial Intracellular Calcium. In: *Vasopressin and Oxytocin: Molecular, Cellular, and Clinical Advances* (Zingg HH,

- Bourque CW, Bichet DG, eds), pp 277–286 *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4871-3_35 [Accessed October 1, 2020].
- Sawchenko PE, Swanson LW (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205:260–272.
- Schmidt RF, Willis WD eds. (2007) Wide Dynamic Range Neuron. In: *Encyclopedia of Pain*, pp 2667–2667. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-29805-2_4873.
- Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*:e52434.
- Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B, Zhang YL (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 258:14647–14651.
- Shiraishi T, Onoe M, Kojima T, Sameshima Y, Kageyama T (1995) Effects of hypothalamic paraventricular nucleus: electrical stimulation produce marked analgesia in rats. *Neurobiology (Bp)* 3:393–403.
- Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL (2005) Agonist-directed trafficking of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 315:828–838.
- Sofroniew MV, Weindl A (1981) Central Nervous System Distribution of Vasopressin, Oxytocin, and Neurophysin A2 - Martinez, Joe L. In: *Endogenous Peptides and Learning and Memory Processes* (Jensen RA, McGaugh RBML, eds), pp 327–369. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124749801500222> [Accessed March 23, 2016].
- Strakova Z, Soloff MS (1997) Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat myometrium during labor: Gi receptor interaction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 272:E870–E876.
- Sufka KJ, Schomburg FM, Giordano J (1992) Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 41:53–56.
- Sun W, Zhou Q, Ba X, Feng X, Hu X, Cheng X, Liu T, Guo J, Xiao L, Jiang J, Xiong D, Hao Y, Chen Z, Jiang C (2018) Oxytocin Relieves Neuropathic Pain Through GABA Release and Presynaptic TRPV1 Inhibition in Spinal Cord. *Front Mol Neurosci* 11:248.
- Swanson LW, McKellar S (1979) The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 188:87–106.

- Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K (2014) Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J Vis Exp*:51785.
- Tjølsen A, Berge O-G, Hunnskaar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method: *Pain* 51:5–17.
- Treede R-D, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630–1635.
- Urban R, Scherrer G, Goulding EH, Tecott LH, Basbaum AI (2011) Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity: *Pain* 152:990–1000.
- Uvnäs-Moberg K, Petersson M (2004) Oxytocin - A biochemical link for human relations. *Lakartidningen* 101:2634–2639.
- van den Burg EH, Stindl J, Grund T, Neumann ID, Strauss O (2015) Oxytocin Stimulates Extracellular Ca²⁺ Influx Through TRPV2 Channels in Hypothalamic Neurons to Exert Its Anxiolytic Effects. *Neuropsychopharmacol* 40:2938–2947.
- Vandermeulen EP, Brennan TJ (2000) Alterations in ascending dorsal horn neurons by a surgical incision in the rat foot. *Anesthesiology* 93:1294–1302; discussion 6A.
- Walker JM, Hohmann AG, Martin WJ, Strangman NM, Huang SM, Tsou K (1999) The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci* 65:665–673.
- Wang J-W, Lundeberg T, Yu L-C (2003) Antinociceptive role of oxytocin in the nucleus raphe magnus of rats, an involvement of mu-opioid receptor. *Regul Pept* 115:153–159.
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H (2002) GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 213:1–47.
- Watson CP (2000) The treatment of neuropathic pain: antidepressants and opioids. *Clin J Pain* 16:S49-55.
- Waxman SG (2011) *Neuroanatomía clínica*. México: El Manual Moderno.
- Wheeler-Aceto H, Cowan A (1991) Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* 104:35–44.
- White SM, North LM, Haines E, Goldberg M, Sullivan LM, Pressly JD, Weber DS, Park F, Regner KR (2014) G-protein $\beta\gamma$ subunit dimers modulate kidney repair after ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Pharmacol* 86:369–377.
- Williams AC de C, Craig KD (2016) Updating the definition of pain. *Pain* 157:2420–2423.

- Williams PD, Anderson PS, Ball RG, Bock MG, Carroll L, Chiu S-HL, Clineschmidt BV, Culberson JC, Erb JM (1994) 1-(((7,7-Dimethyl-2(S)-(2(S)-amino-4-(methylsulfonyl)butyramido)bicyclo[2.2.1]heptan-1(S)-yl)methyl)sulfonyl)-4-(2-methylphenyl)piperazine (L-368,899): An Orally Bioavailable, Non-Peptide Oxytocin Antagonist with Potential Utility for Managing Preterm Labor. *J Med Chem* 37:565–571.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:544–547.
- Woolf CJ (2010) What is this thing called pain? *J Clin Invest* 120:3742–3744.
- Woolf CJ (2011) Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152:S2-15.
- Yam MF, Loh YC, Tan CS, Khadijah Adam S, Abdul Manan N, Basir R (2018) General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *Int J Mol Sci* 19 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121522/> [Accessed January 22, 2021].
- Yang J, Chen J, Song C-Y, Liu W-Y, Wang G, Wang C, Lin B-C (2006) 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* 1069:127–138.
- Yang J, Yang Y, Chen J-M, Liu W-Y, Wang C-H, Lin B-C (2007) Central oxytocin enhances antinociception in the rat. *Peptides* 28:1113–1119.
- Yao S, Bergan J, Lanjuin A, Dulac C (2017) Oxytocin signaling in the medial amygdala is required for sex discrimination of social cues. *Elife* 6:e31373.
- Yasenkov R, Deboer T (2012) Circadian modulation of sleep in rodents. In: *Progress in Brain Research*, pp 203–218. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444594273000125> [Accessed January 8, 2020].
- Ye G-L, Savelieva KV, Vogel P, Baker KB, Mason S, Lanthorn TH, Rajan I (2015) Ligation of mouse L4 and L5 spinal nerves produces robust allodynia without major motor function deficit. *Behav Brain Res* 276:99–110.
- Yehuda, Leprohon-Greenwood CE, Dixon LM, Coscina DV (1986) Effects of dietary fat on pain threshold, thermoregulation and motor activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 24:1775–1777.
- Yu SQ, Lundeberg T, Yu LC (2003) Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Res* 983:13–22.

- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.
- Zingg HH, Grazzini E, Breton C, Larcher A, Rozen F, Russo C, Guillon G, Mouillac B (1998) Genomic and non-genomic mechanisms of oxytocin receptor regulation. *Adv Exp Med Biol* 449:287–295.

APÉNDICE

A. EFECTOS PER SE DE LOS ANTAGONISTAS USADOS EN LA PRUEBA DE LA FORMALINA.

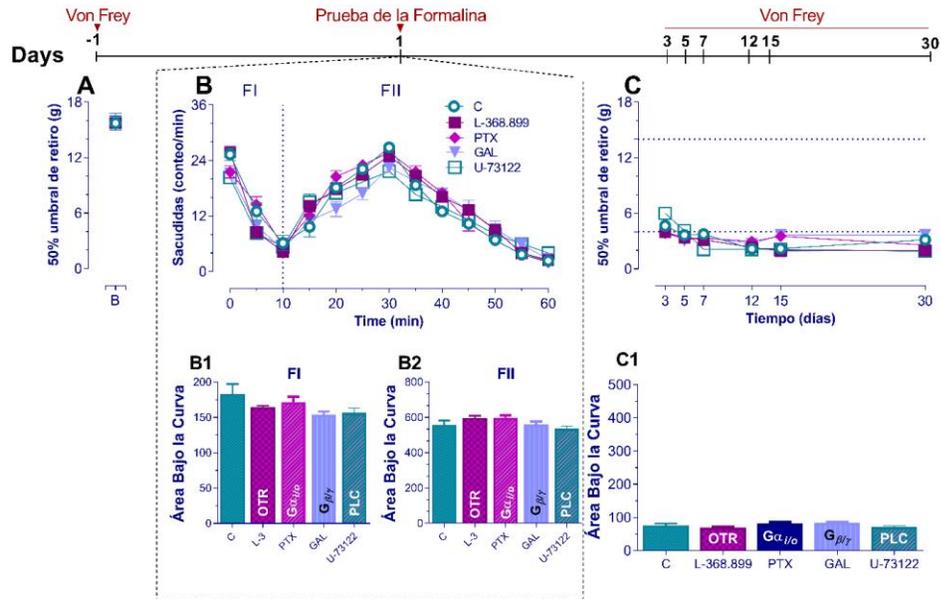


Figura Suplementaria 1. Efectos *per se* de L-368,899, PTX, GAL y U-73122. (A) Umbral de retiro de la pata. El panel (B) muestra el curso temporal temprano durante la fase I (FI) y la fase II (FII) del número de sacudidas de la pata por minuto provocadas por la formalina. Además, el efecto *per se* del pretratamiento i.t. con: (i) L-368,899 (antagonista de OTR); (ii) Toxina *Pertussis* (PTX, inhibidor de la proteína $G_{\alpha i/o}$); (iii) galeína (GAL, inhibidor de señalización de la subunidad $G_{\beta\gamma}$) o (iv) del U-73122 (inhibidor de los procesos de la fosfolipasa C_{β} , PLC_{β}). Tenga en cuenta que L-368,899, PTX, GAL o U-73122 no tuvieron efecto *per se* sobre la nocicepción inducida por la administración s.c. de formalina 1%. El panel (B1) y (B2) resume el efecto de los diferentes tratamientos durante la nocicepción temprana provocada por la formalina. L-368,899, PTX, GAL o U-73122 no tuvieron efecto *per se* sobre la nocicepción inducida por la administración de formalina 1%. El panel (C) ilustra la evolución temporal del umbral de retiro de la pata y muestra que, L-368,899, PTX, GAL o U-73122 no tuvieron efecto *per se* sobre la nocicepción a largo plazo inducida por la administración de formalina 1%. El análisis estadístico se determinó mediante un análisis simple de varianza (ANOVA).

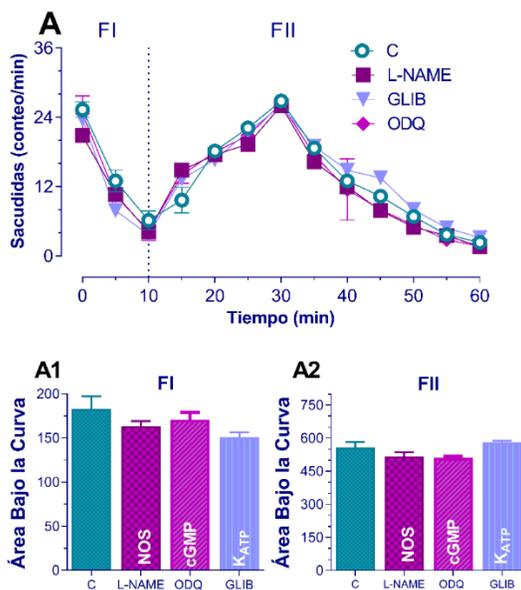


Figura Suplementaria 2. Efecto *per se* de L-NAME, ODQ y glibenclamida. En (A) se representa el curso temporal de los diferentes tratamientos durante la fase I (FI) y la fase II (FII) del número de sacudidas de la pata minuto. La administración i.t. de (i) clorhidrato de éster metílico de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa [NOS]); (ii) ODQ (un inhibidor de la guanilil ciclasa soluble [GC]); o (iii) glibenclamida (GLIB, bloqueador de los canales de K^{+}_{ATP}), no modificaron la nocicepción generada por la administración s.c. de formalina 1%. El panel (A1) y (A2) muestra el efecto de los diferentes tratamientos durante la nocicepción temprana provocada por la formalina. Tenga en cuenta que la administración de L-NAME, ODQ y GLIB no modificaron la nocicepción generada por la administración s.c. de formalina 1%. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis simple de varianza (ANOVA).

B. LISTA DE PUBLICACIONES Y RESÚMENES EN CONGRESOS

Publicaciones derivadas de la presente tesis

- (i) **Espinosa de Los Monteros-Zúñiga, A.**, Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., & González-Hernández, A. (2021) In Vivo Dissection of Two Intracellular Pathways Involved in the Spinal Oxytocin-Induced Antinociception in the Rat. *ACS Chem Neurosci*, 12, 3140–3147.
- (ii) **Espinosa De Los Monteros-Zúñiga A**, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A. Intrathecal Oxytocin Improves Spontaneous Behavior and Reduces Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Postoperative Pain. *Front Pharmacol*. 2020; 11:581544.
- (iii) González-Hernández A, **Espinosa De Los Monteros-Zuñiga A**, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. Recurrent antinociception induced by intrathecal or peripheral oxytocin in a neuropathic pain rat model. *Exp Brain Res*. 2019 237(11):2995-3010.

Publicaciones derivadas de colaboraciones

- (i) Gamal-Eltrabily M, **Espinosa de Los Monteros-Zúñiga A**, Manzano-García A, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A. The Rostral Agranular Insular Cortex, a New Site of Oxytocin to Induce Antinociception. *J Neurosci*. 2020; 40(29):5669-5680.
- (ii) Mata-Bermudez A, Izquierdo T, **de Los Monteros-Zuñiga E**, Coen A, Godínez-Chaparro B. Antiallodynic effect induced by [6]-gingerol in neuropathic rats is mediated by activation of the serotonergic system and the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate-adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel pathway. *Phytother Res*. 2018; 32(12):2520-2530.

Resúmenes en congresos

- (i) **Espinosa de los Monteros-Zúñiga A**, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A. Spinal oxytocin inhibits early and late formalin-induced nociception by recruitment of two differential intracellular pathways. VII Congreso de la Rama de Transducción de Señales, Querétaro. Noviembre 4-7, 2019.
- (ii) **Espinosa de Los Monteros-Zúñiga A**, Manzano-García A, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A. Mecanismos intracelulares en la antinocicepción conductual inducida por la administración espinal de oxitocina en ratas. LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Querétaro 2019.
- (iii) González-Hernández A, **Espinosa de los Monteros-Zúñiga A**, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. La administración recurrente intratecal o periférica de oxitocina disminuye la conducta de dolor neuropático. LXII Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (SMCF), Querétaro. 11-15 agosto 2019.
- (iv) González-Hernández A, **Espinosa de los Monteros-Zúñiga A**, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. Spinal oxytocin inhibits early and late formalin-induced nociception by recruitment of two differential intracellular pathways. The 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN), Chicago, EUA. Octubre 19-23, 2019.
- (v) Manzano-García A, González-Hernández A, **Espinosa de los Monteros-Zúñiga A**, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. Paraventricular hypothalamic stimulation restores spontaneous day/night activity in rats with neuropathic pain through spinal oxytocin receptors activation. The 48th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN), San Diego, EUA. Noviembre 3-7, 2018.