



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

**Participación de la vía HMGB1-TLR4 y su efecto sobre el canal TRPV1 en la
alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR en ratas**

Tesis que presenta

M.V.Z. Carlos Javier Martínez Magaña

Para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de Tesis: Dra. Janet Murbartián Aguilar

Ciudad de México, agosto 2020

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 4 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Janet Murbartían Aguilar. Durante su realización se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del Programa de becas Nacionales, con la beca de maestría número 723051.

AGRADECIMIENTOS

Al Cinvestav y al CONACYT, las instituciones que hicieron posible este trabajo al facilitarme los recursos materiales, humanos y apoyo económico que permitieron su conclusión.

A la Dra. Janet Murbartián Aguilar, por brindarme la confianza de formar parte de su laboratorio y ser mi mentora en la investigación científica.

Al comité sinodal formado por el Dr. Vinicio Granados Soto y la Dra. Myrna Déciga Campos, por sus valiosas críticas, comentarios y aportaciones que nutrieron sustancialmente este trabajo.

A mis compañeros y maestros del laboratorio 4, Dra. Guadalupe García, M. en C. Alejandro Pluma y Q.F.B. Diana Velázquez, por su gran disposición e incondicional apoyo.

A Mónica, Emilia y Tamara, por su amor que es mi motor y fuerza.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | I |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IV |
| RESUMEN..... | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Aspectos generales sobre el dolor | 1 |
| 1.1.1 Definición del dolor..... | 1 |
| 1.1.2 Clasificación del dolor | 2 |
| 1.1.3 Fundamentos sobre nocicepción | 5 |
| 1.2 El sueño | 6 |
| 1.2.1 Ciclo del sueño..... | 7 |
| 1.2.2 Trastornos de sueño y alteraciones en la nocicepción..... | 9 |
| 1.3 Receptor TLR4..... | 14 |
| 1.3.1 Activación y señalización canónica del TLR4 | 15 |
| 1.4 Proteína HMGB1 | 17 |
| 1.5 Participación del receptor TLR4 en el dolor..... | 20 |
| 1.6 Participación de HMGB1 en el dolor | 21 |
| 1.7 Canal TRPV1 | 22 |
| 1.7.1 Estructura del canal TRPV1 | 24 |
| 1.7.2 Agentes activadores y regulación de la actividad del TRPV1 | 25 |
| 1.8 TRPV1 y alteraciones de la nocicepción | 27 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 29 |
| 2.1 Regulación de TRPV1 mediada por el TLR4..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 3. JUSTIFICACIÓN | 31 |
| 4. HIPÓTESIS | 31 |
| 5. OBJETIVOS | 32 |
| 5.1 Objetivo general | 32 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 32 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 6.1 Animales..... | 33 |
| 6.2 Fármacos | 33 |
| 6.3 Modelo de privación de sueño MOR | 33 |
| 6.4 Evaluación de la nocicepción mecánica | 35 |
| 6.5 Administración intratecal de fármacos..... | 36 |
| 6.6 Prueba de coordinación motriz..... | 37 |
| 6.7 Inmunodetección de proteínas por <i>Western blot</i> | 37 |
| 6.7.1 Extracción y procesamiento de tejidos..... | 37 |
| 6.7.2 Cuantificación de proteínas totales | 38 |
| 6.7.3 <i>Western blot</i> | 38 |
| 6.8 Análisis estadístico..... | 39 |
| 6.9 Diseño experimental..... | 40 |
| 6.9.1 Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro inducidos por privación de sueño MOR | 40 |
| 6.9.2 Determinación de la participación de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 40 |
| 6.9.3 Identificación de la participación de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el desarrollo de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR .. | 41 |

| | |
|---|----|
| 6.9.4 Determinación del curso temporal de la expresión de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el modelo de privación de sueño MOR mediante <i>Western blot</i> | 41 |
| 6.9.5 Identificación de cambios en la actividad y expresión de TRPV1 mediados por TLR4..... | 42 |
| 7. RESULTADOS | 43 |
| 7.1 La privación de sueño MOR indujo el desarrollo de alodinia táctil en ratas | 43 |
| 7.2 El inhibidor de HMGB1 (glicirricina) revirtió la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 44 |
| 7.3 El antagonista del TLR4 (LPS-RS) revirtió la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 45 |
| 7.4 El antagonista del receptor TRPV1 (A784168) revirtió la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR | 46 |
| 7.5 Efecto de los vehículos y concentraciones máximas de los fármacos sobre el umbral de retiro en ratas naïve | 47 |
| 7.6 Los fármacos probados no afectaron la coordinación motriz | 48 |
| 7.7 El pretratamiento con LPS-RS impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por P-MOR..... | 49 |
| 7.8 El pretratamiento con glicirricina impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR | 50 |
| 7.9 El pretratamiento con A784168 no impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por P-MOR | 51 |
| 7.10 El pretratamiento con LPS-RS abatió el efecto antialodínico del A784168..... | 52 |
| 7.11 La privación de sueño MOR aumentó la expresión de HMGB1 en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal dorsal | 54 |

| | |
|---|----|
| 7.12 La privación de sueño MOR no modificó la expresión de TLR4 en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal dorsal | 55 |
| 7.13 La privación de sueño MOR aumentó la expresión de TRPV1 en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal dorsal | 56 |
| 7.14 El pretratamiento con LPS-RS atenuó el aumento en la expresión del canal TRPV1 en ratas sometidas a privación de sueño MOR..... | 57 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 58 |
| 8.1 Alteraciones de la nocicepción inducidas por la privación de sueño MOR y sus probables mecanismos generadores..... | 58 |
| 8.2 Participación de la alarmina HMGB1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR | 62 |
| 8.3 Participación del receptor TLR4 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 65 |
| 8.4 Participación del canal TRPV1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 69 |
| 8.5 Participación del receptor TLR4 en la regulación de la función y expresión del canal TRPV1 durante la privación de sueño MOR..... | 71 |
| 9. CONCLUSIONES | 74 |
| 10. PERSPECTIVAS | 75 |
| 11. REFERENCIAS | 76 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Clasificación del dolor con base en su origen neurobiológico | 4 |
| Figura 2. Caracterización electroencefalográfica del sueño | 8 |
| Figura 3. Vías de transducción canónicas acopladas al receptor TLR4 | 16 |
| Figura 4. Receptores de la alarmina HMGB1 | 19 |
| Figura 5. Representación esquemática de una subunidad monomérica del receptor TRPV1 | 24 |
| Figura 6. Representación de la caja experimental utilizada para replicar el modelo de privación de sueño MOR mediante tanque con agua y plataformas múltiples . | 34 |
| Figura 7. Técnica de inyección transcutánea directa para administración intratecal. | 36 |
| Figura 8. Diseño experimental 1..... | 40 |
| Figura 9. Diseño experimental 3..... | 41 |
| Figura 10. Diseño experimental 5..... | 42 |
| Figura 11. Efecto de la privación de sueño MOR sobre el 50% del umbral de retiro en ratas | 43 |
| Figura 12. Efecto de la glicirricina sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR | 44 |
| Figura 13. Efecto del LPS-RS sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR | 45 |
| Figura 14. Efecto del A784168 sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR | 46 |
| Figura 15. Efecto de los vehículos y concentraciones máximas de los fármacos en ratas naïve | 47 |
| Figura 16. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 49 |
| Figura 17. Efecto del pretratamiento con glicirricina sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 50 |
| Figura 18. Efecto del pretratamiento con A784168 sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR..... | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre el efecto antinociceptivo del A784168 en animales con privación de sueño MOR..... | 52 |
| Figura 20. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre el efecto antinociceptivo del A784168..... | 53 |
| Figura 21. Cambios en la expresión de HMGB1 inducidos por privación de sueño MOR..... | 54 |
| Figura 22. Efecto de la privación de sueño MOR sobre la expresión de TLR4 | 55 |
| Figura 23. Cambios en la expresión de TRPV1 inducidos por privación de sueño MOR..... | 56 |
| Figura 24. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre la expresión de TRPV1 en ratas sometidas a privación de sueño MOR..... | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Estudios representativos en humanos sobre los efectos de la privación de sueño en el dolor..... | 11 |
| Tabla 2. Estudios representativos en modelos animales sobre los efectos de la privación de sueño en el dolor | 12 |
| Tabla 3. Principales patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y receptores sobre los cuales tienen actividad | 17 |
| Tabla 4. Agonistas y antagonistas del receptor TRPV1..... | 26 |
| Tabla 5. Concentraciones de fármacos utilizadas | 41 |
| Tabla 6. Resultados de la prueba de coordinación motriz | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| °C | Grados Celsius |
| 12-S-HPETE | Ácido 12-hidroxeicosatetraenoico |
| 5-HT | 5 hidroxitriptamina (serotonina) |
| A784168 | 3,6-dihidro-3'-(trifluorometil)- <i>N</i> -[4-[(trifluorometil)sulfonil]fenil]-[1(2 <i>H</i>),2'-bipiridina]-4-carboxamida |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| Ca ²⁺ | Iones calcio |
| CaM | Calcio-calmodulina |
| CaMKII | Calcio calmodulina cinasa 2 |
| CCK2 | Receptor de colecistocinina B |
| CCL2 | Ligando-quimiocina 2 (antes proteína quimioatrayente de monocitos 1) |
| CD24 | Grupo de diferenciación 24 |
| CD40 | Grupo de diferenciación 40 |
| CD91 | Grupo de diferenciación 91 |
| CE ₅₀ | Concentración efectiva 50 |
| CGRP | Péptido relacionado con el gen de la calcitonina |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| cm | Centímetro |
| CXCL12 | Ligando-quimiocina 12 |
| CXCL8 | Ligando-quimiocina 8 (antes interleucina 8) |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño (alarminas) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EEG | Electroencefalografía |
| g | Gramos |

| | |
|------------------|--|
| G | Unidades Gauge |
| GABA | Ácido gamma aminobutírico |
| GFAP | Proteína ácida fibrilar glial |
| GL | Glicirricina |
| GRD | Ganglio de la raíz dorsal |
| h | Horas |
| H ⁺ | Protones (hidrogeniones) |
| HMGB1 | Proteína de caja de alta movilidad tipo 1 |
| HSPs | Proteínas de choque térmico |
| Hz | Hertz |
| IASP | Organización Internacional para el Estudio del Dolor |
| IL | Interleucina |
| IL-1 β | Interleucina 1 beta |
| INF | Interferón |
| IRF3 | Factor regulador de interferón 3 |
| K ⁺ | Iones potasio |
| KDa | Kilodalton |
| KO | Animal knock-out |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LPS-RS | LPS de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> |
| Mac-1 | Antígeno de macrófagos 1 |
| MD-2 | Proteína co-receptora de diferenciación mieloide 2 |
| mg | Miligramos |
| Mg ²⁺ | Iones magnesio |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| MOR | Movimientos oculares rápidos (fase del sueño) |
| MYD88 | Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 |
| n | Número (de individuos en grupo experimental) |

| | |
|------------------|--|
| Na ⁺ | Iones sodio |
| Nav | Canales para sodio regulados por voltaje |
| NF-κB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| ng | Nanogramos |
| NGF | Factor de crecimiento nervioso |
| NK | Células asesinas naturales (NK) |
| NLRP3 | Proteína 3 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD (antes crioporina) |
| nm | Nanomolar |
| no-MOR | Sin movimientos oculares rápidos (fase del sueño) |
| P1 | Receptores purinérgicos de adenosina |
| P2X | Receptor purinérgico P2X |
| P2Y | Receptor purinérgico P2Y |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | Búfer fosfato salino |
| PGE ₂ | Prostaglandina E2 |
| pH | Potencial de hidrogeniones |
| PI3K | Fosfatidil inositol 3 cinasa |
| PIP ₂ | Fosfatidil inositol bifosfato |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PreTx | Pretratamiento |
| PVDF | Fluoruro de polivinilideno |
| RAGE | Receptor para productos finales de glicosilación avanzada |
| RIPA | Búfer de ensayos de radioinmunoprecipitación |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| Siglec | Lectinas similares a inmunoglobulinas con ácido siálico |
| SNK | Prueba post-hoc Student-Newman-Keuls |

| | |
|--------------|--|
| TIR | Región homóloga Toll/Interleucina 1 |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TRIF | Adaptador con dominio TIR inductor de interferón β |
| TRP | Receptores de potencial transitorio |
| TRPA | Receptores de potencial transitorio ankirina |
| TRPC | Receptores de potencial transitorio canónicos |
| TRPM | Receptores de potencial transitorio melastatina |
| TRPML | Receptores de potencial transitorio mucolipina |
| TRPP | Receptores de potencial transitorio policistina |
| TRPV | Receptores de potencial transitorio vanilloides |
| TRPV1 | Canal de potencial transitorio vanilloide tipo 1 |
| V | Voltios |
| μ l | Microlitros |

RESUMEN

El dolor y el sueño están relacionados de forma bidireccional y recíproca, puesto que experimentar dolor suele irrumpir el sueño a la vez que los trastornos de sueño pueden agravar condiciones de dolor preexistentes. La privación de sueño, particularmente la fase de movimientos oculares rápidos (sueño MOR), induce estados de hipersensibilidad dolorosa a estímulos mecánicos y térmicos, sin que hasta el momento se conozcan los mecanismos implicados en la fisiopatología del fenómeno. El objetivo de este estudio fue determinar la participación de la vía HMGB1-TLR4 y del canal TRPV1 en el desarrollo y el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR en ratas. Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos sometidas a un periodo de dos días de privación de sueño MOR por el método de tanque con agua y plataformas múltiples. Se evaluaron cambios en el umbral de retiro de la pata con filamentos de von Frey, así como cambios en la expresión de las proteínas de interés mediante *Western blot*. Los datos obtenidos indican que la privación de sueño MOR induce un estado de alodinia mecánica generalizada en ambos sexos, que se revierte tras la administración intratecal de glicirricina (inhibidor de HMGB1), LPS-RS (antagonista de TLR4) y A784168 (bloqueador de TRPV1). El pretratamiento con glicirricina y LPS-RS, pero no con A784168, impidió el desarrollo de alodinia táctil, a la vez que el pretratamiento con LPS-RS redujo el efecto antialodínico del bloqueador del canal TRPV1. Adicionalmente, el análisis por *Western blot* reveló que la privación de sueño MOR induce sobreexpresión de la proteína HMGB1 y el canal TRPV1 en ganglios de la raíz dorsal y en la porción dorsal de la médula espinal, pero no se observaron cambios en la expresión de TLR4. Finalmente, el pretratamiento con LPS-RS atenuó la sobreexpresión de TRPV1 en ganglio de la raíz dorsal y en médula espinal dorsal. En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la señalización por la vía HMGB1-TLR4 participa en el desarrollo de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR en ratas, mientras que HMGB1, TLR4 y el canal TRPV1 participan en su mantenimiento.

ABSTRACT

Pain and sleep are bi-directionally and reciprocally related phenomena, since experiencing of pain often disrupts sleep, while sleep disturbances can aggravate pre-existing pain conditions. Sleep deprivation, especially the rapid eye movement phase (REM sleep), induces states of painful hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli, but the mechanisms involved in the physiopathology of the phenomenon are not well known. The aim of this study was to determine the role of the HMGB1-TLR4 signaling pathway and the TRPV1 channel in the development and maintenance of tactile allodynia induced by REM sleep deprivation in rats. Male and female Wistar rats were subjected to two-days of REM sleep deprivation using the water tank and multi-platform method. Von Frey filaments were used to determine the paw withdrawal threshold, and protein expression was determined by Western blot. The data obtained indicates that REM sleep deprivation induces a generalized mechanical allodynia state in both sexes, which is reversed by intrathecal administration of glycyrrhizin (HMGB1 inhibitor), LPS-RS (TLR4 antagonist) and A784168 (TRPV1 blocker). Furthermore, pretreatment with glycyrrhizin and LPS-RS, but not with A784168, prevented the development of tactile allodynia, while pretreatment with LPS-RS reduces the antiallodynic effect of the TRPV1 blocker. Western blot analysis revealed that REM sleep deprivation induces overexpression of the HMGB1 protein and TRPV1 channel in dorsal root ganglia and dorsal portion of spinal cord, but no changes in TLR4 expression were observed. Finally, LPS-RS pretreatment attenuated TRPV1 overexpression in the dorsal root ganglion and dorsal spinal cord. Taken together, the data obtained suggests that HMGB1-TLR4 signaling pathway participates in the development of tactile allodynia induced by REM sleep deprivation in rats, while HMGB1 alarmin, TLR4 receptor and TRPV1 channel participate in its maintenance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales sobre el dolor

1.1.1 Definición del dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP por sus siglas en inglés) define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial, que se describe en términos de dicho daño” (Merskey et al., 1979). Esta definición es ampliamente aceptada y enfatiza el hecho de que el dolor es una sensación consciente cuyas cualidades son subjetivas (Cohen et al., 2018). El dolor es resultado de un proceso neural complejo, en el cual participan neuronas sensoriales especializadas en la detección de estímulos nocivos (señales de daño tisular), tractos nerviosos que conducen esta información a centros supraespinales donde se genera propiamente la sensación y sistemas de modulación que pueden facilitar o atenuar la transmisión de información nociceptiva según el contexto (Steeds, 2016). La interpretación de señales nociceptivas dolorosas está influida por factores genéticos, emocionales, cognitivos y en algunos casos, patológicos (Tracey y Mantyh, 2007). El dolor puede variar en cuanto a su magnitud (leve, moderado, grave), localización (superficial, profundo, localizado, difuso), su temporalidad (agudo, intermitente, crónico), su cualidad (palpitante, ardiente, punzante) y sus componentes afectivos asociados, generalmente descritos en términos de sufrimiento (agobiante, torturador) (Woolf, 2004).

Experimentar dolor suele desencadenar acciones reflejas de evitación hacia aquellos agentes capaces de generar daño, o bien, conductas de protección a las zonas lesionadas (Basbaum et al., 2009). Debido a ello, se plantea que la percepción del dolor se ha desarrollado evolutivamente como un mecanismo que procura la integridad y supervivencia de los organismos capaces de experimentarlo (Smith et al., 2011). Sin embargo, diversas alteraciones y cambios plásticos en los nociceptores y las vías encargadas de conducir información nociceptiva al encéfalo pueden generar que la percepción del dolor se intensifique, que se prolongue más allá del tiempo requerido en el proceso de curación de un

tejido lesionado, o incluso que se presente en ausencia aparente de algún estímulo. En esas condiciones, el dolor pierde su función como sistema de alerta y se transforma en una sensación patológica, persistente y debilitante (Woolf, 2004). Dos fenómenos principales caracterizan a los estados de hipersensibilidad al dolor: la alodinia, que se define como la percepción de estímulos inocuos como dolorosos y la hiperalgesia, en la cual, estímulos que normalmente se perciben como dolorosos generan una sensación de mayor intensidad (Basbaum et al., 2009).

1.1.2 Clasificación del dolor

De acuerdo con su temporalidad el dolor se clasifica en agudo y crónico. El dolor agudo es un fenómeno de corta duración, generalmente asociado a daño tisular vigente. Suele ser una sensación con localización restringida al lugar de la lesión, con intensidad proporcional a la magnitud del estímulo que lo produce y normalmente se atenúa o desaparece conforme se resuelve el daño (Kuner, 2010). Por su parte el dolor crónico tiene duración mayor a 3 meses (Merskey y Bogduk, 1994). Su etiología y patrón de evolución son diversos, pero se caracteriza por carecer de utilidad protectora y ser el resultado de actividad neural alterada a nivel periférico y/o central. El dolor crónico se considera patológico en sí mismo y es un problema grave de salud que a menudo se asocia con altos niveles de discapacidad funcional (King et al., 2011).

Tomando en cuenta el mecanismo neurobiológico que genera el dolor, éste se clasifica en nociceptivo, inflamatorio, neuropático y disfuncional (**Figura 1**).

Dolor nociceptivo (**Figura 1A**): Es una sensación aguda con función de alerta que se relaciona con la detección temprana de estímulos nocivos de gran intensidad, principalmente mecánicos y térmicos. Suele desencadenar reflejos motores que ayudan a evitar o minimizar el daño, mientras que la incomodidad y angustia emocional que lo acompañan indican al organismo la necesidad de proteger el área donde incidió el estímulo (Woolf, 2010).

Dolor inflamatorio (**Figura 1B**): Es el dolor causado por la activación del sistema inmunológico tras una lesión o infección. Es resultado de la secreción de diversas sustancias por los tejidos lesionados (protones [H⁺], ATP), por parte de células del sistema inmune (bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas, citocinas proinflamatorias, quimiocinas) y por los nociceptores mismos (sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)) que en conjunto constituyen la llamada “*sopa inflamatoria*” (Basbaum et al., 2009). Estas sustancias activan directamente a los nociceptores e inducen ajustes en la expresión y función de receptores y canales iónicos en su membrana generando un proceso conocido como sensibilización periférica, en el cual los nociceptores manifiestan hiperexcitabilidad que conduce a un estado de hiperalgesia (Costigan y Woolf, 2000). Este tipo de dolor se considera adaptativo y protector, ya que el aumento de sensibilidad en el área lesionada y zonas circundantes evita un daño mayor y promueve la recuperación.

Dolor neuropático (**Figura 1C**): Es un tipo de dolor que surge a consecuencia de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial (Treede et al., 2008). Como resultado del daño se generan potenciales de acción ectópicos, facilitación y desinhibición de la transmisión sináptica en las vías que conducen información nociceptiva, pérdida de conectividad o formación de circuitos neuronales aberrantes e interacciones neuroinmunes. En el dolor neuropático, el dolor se produce espontáneamente y las respuestas a estímulos inocuos y nocivos se amplifican patológicamente (Costigan et al., 2009).

Dolor disfuncional (**Figura 1D**): Es el dolor caracterizado por un procesamiento central anormal de la información nociceptiva, que se genera en ausencia de estimulación sobre los nociceptores y sin daño neuronal o proceso inflamatorio identificable (Fong y Schug, 2014). Algunas patologías que cursan con dolor disfuncional son la fibromialgia, síndrome de colon irritable, cefalea tensional y síndrome temporomandibular (Woolf, 2010).

El dolor nociceptivo e inflamatorio se consideran fisiológicos o adaptativos, puesto que protegen al organismo de estímulos dañinos o promueven la curación del

tejido lesionado. En contraste, el dolor neuropático y disfuncional son maladaptativos o patológicos, ya que son manifestaciones de un funcionamiento anormal de los componentes del sistema nervioso sensorial implicados en la nocicepción (Woolf, 2004).

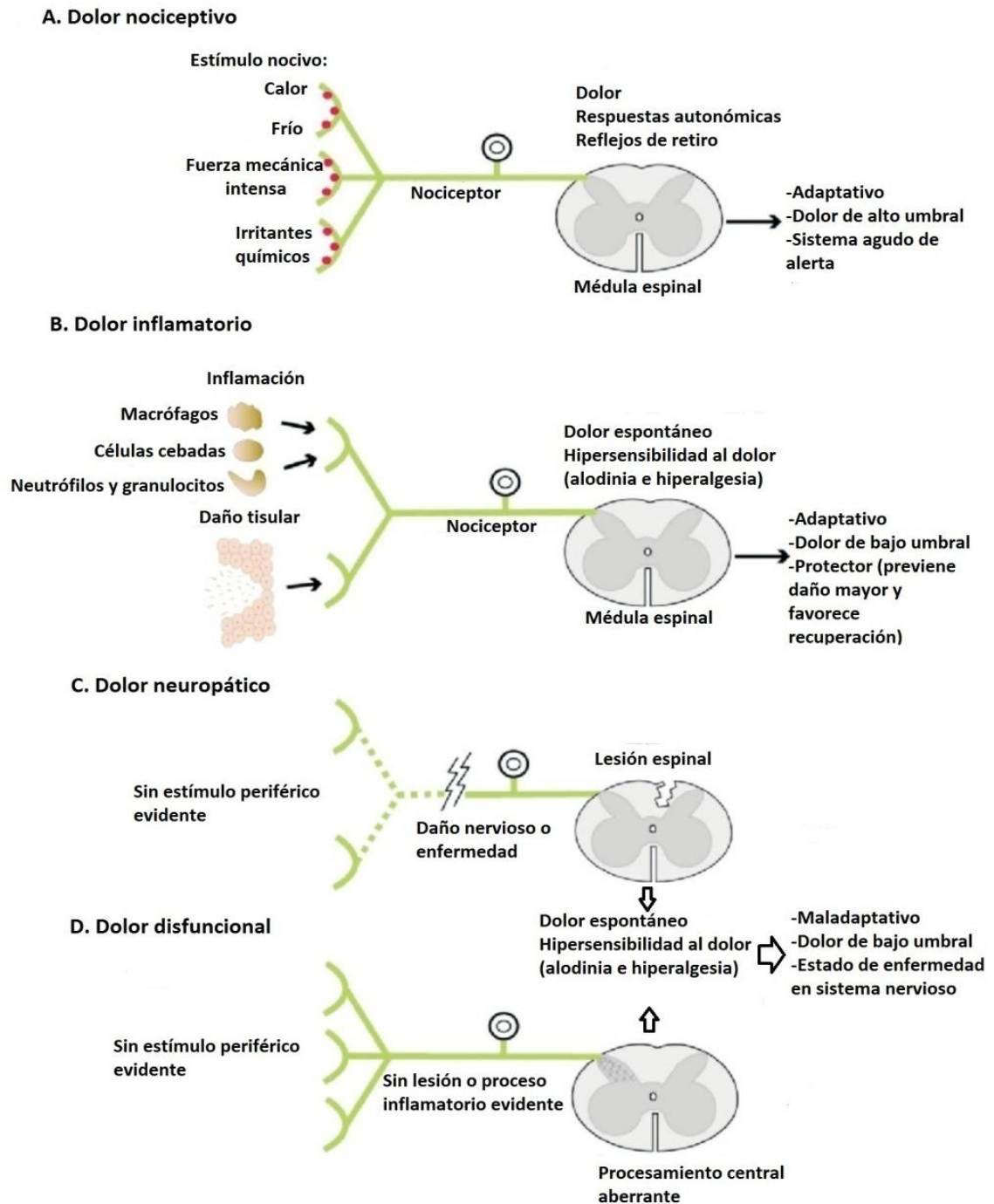


Figura 1. Clasificación del dolor con base en su origen neurobiológico: A) Nociceptivo, B) Inflamatorio, C) Neuropático, D) Disfuncional (Modificada de Woolf, 2004).

1.1.3 Fundamentos sobre nocicepción

La nocicepción se define como el conjunto de procesos neurobiológicos mediante los cuales una subpoblación de neuronas aferentes primarias denominadas nociceptores detectan estímulos nocivos o señales de daño en el organismo, que a la postre, son decodificados en el sistema nervioso central dando lugar a la sensación dolorosa. La nocicepción comprende cuando menos cinco procesos básicos (Woolf, 2004):

Transducción: Consiste en la detección de estímulos nocivos que activan canales iónicos y receptores membranales específicos generando cambios de potencial de membrana en los nociceptores (potenciales de receptor), con la consecuente generación de potenciales de acción. En condiciones fisiológicas los nociceptores son neuronas de alto umbral, lo que permite desarrollar actividades cotidianas sin experimentar dolor, pero tienen sensibilidad suficiente para identificar señales de daño (Patapoutian et al., 2009). Entre los estímulos que detectan los nociceptores se encuentran sustancias cuya presencia aumenta en el contexto de daño tisular como el K^+ , hidrogeniones, histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos y bradicinina, así como estímulos mecánicos de alta intensidad y temperaturas extremas (Schaible et al., 2011).

Conducción: Es la propagación de potenciales de acción a lo largo del axón de los nociceptores, desde su terminal periférica hacia la terminal central.

Transmisión: Se refiere al relevo de información entre neuronas. Los potenciales de acción propagados en la neurona aferente primaria en dirección anterógrada inducen la secreción de moléculas neuromediadoras desde su terminal central, responsables de transmitir la información nociceptiva a las neuronas de segundo orden localizadas en el asta dorsal de la médula espinal, las cuales a su vez transmiten la información a centros supraespinales.

Percepción: Se refiere a la integración consciente de las señales nociceptivas, que son decodificadas junto con factores emocionales y cognoscitivos dando lugar a la

experiencia dolorosa. La percepción del dolor es subjetiva y requiere la participación de varias estructuras cerebrales.

Modulación: Consiste en procesos activos de facilitación o inhibición de la transmisión sináptica en las vías que conducen información nociceptiva, principalmente a nivel del asta dorsal de la médula espinal. La modulación permite atenuar o intensificar la percepción del dolor según resulte conveniente en un contexto determinado.

1.2 El sueño

El sueño se define como un estado fisiológico reversible de disminución de la percepción y capacidad de respuesta al entorno, acompañado de recumbencia postural e inactividad (Cirelli y Tononi, 2008). Se le atribuyen diversas funciones que promueven el mantenimiento y restablecimiento del equilibrio fisiológico después del periodo de vigilia (Kumar y Chanana, 2014). Entre éstas se encuentran la eliminación de radicales libres, regulación de la actividad eléctrica cortical, termorregulación, regulación metabólica y endocrina, homeostasis sináptica y remodelación dendrítica, activación inmunológica y consolidación de la memoria (Tononi y Cirelli, 2006; Vasalli y Dijk, 2009; Diekelmann y Born, 2010; Yang et al., 2014).

Desde el aspecto evolutivo, el sueño o los estados de reposo análogos al sueño se conservan en prácticamente todos los grupos taxonómicos y especies animales, lo que sugiere que cumple un propósito común que beneficia la supervivencia (Miyazaki et al., 2017). El sueño es crucial para mantener la integridad funcional del organismo. La privación de sueño en ratas por periodos prolongados genera pérdida de peso corporal, lesiones cutáneas severas y debilitamiento progresivo que culmina en la muerte tras un par de semanas (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen y Bergmann, 2002).

El sueño es un estado dinámico que se describe con base en parámetros conductuales, fisiológicos y electrofisiológicos (Andersen et al., 2018). Desde el

punto de vista conductual, se caracteriza por disminución del estado de conciencia, aumento en el umbral sensorial a estímulos externos, por presentarse una postura de sueño característica en cada especie, estar asociado a relajación muscular, inmovilidad y por su reversibilidad. Con base en la actividad electrofisiológica cerebral y de los músculos esqueléticos, el sueño consta de dos fases que se alternan cíclicamente en el transcurso de un periodo de descanso: el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y el sueño sin movimientos oculares rápidos (no-MOR) (Eban-Rothschild et al., 2018). Otros parámetros fisiológicos como la temperatura corporal, la secreción de algunas hormonas y la regulación respiratoria y cardiovascular muestran diferentes patrones durante el sueño MOR y no-MOR (Scammell et al., 2017).

1.2.1 Ciclo del sueño

El electroencefalograma (EEG), un registro gráfico de las oscilaciones en la actividad eléctrica cerebral, muestra durante la vigilia ondas tipo alfa y beta que fluctúan entre los 7.5-12.5 Hz y 12.5-30 Hz de frecuencia, respectivamente. La actividad de tipo alfa es característica de una condición de relajación y tranquilidad, mientras que la actividad tipo beta corresponde a estados de atención y alerta. Durante el sueño ocurren cambios característicos en el patrón de actividad electroencefalográfica (**Figura 2**) que permiten dividirlo en sus dos grandes etapas: el sueño no-MOR y el sueño MOR (American Academy of Sleep Medicine, 2007).

Un episodio de sueño siempre comienza en etapa no-MOR, que a su vez se divide en varias fases:

Fase 1 o N1: Se caracteriza por un estado de somnolencia o sueño ligero en el que resulta fácil despertar. El tono muscular disminuye, pero se pueden observar sacudidas musculares súbitas llamadas mioclonías hípnicas. En el EEG se observa un descenso paulatino de actividad tipo alfa a actividad tipo theta (4-8 Hz). También disminuyen la frecuencia cardíaca y respiratoria.

Fase 2 o N2: El ECG presenta patrones de oscilación lenta llamados complejos K, con picos breves de actividad elevada llamados husos del sueño (7-14 Hz). Suele ser la etapa más larga del ciclo. La frecuencia cardíaca, respiratoria y el tono muscular son menores que en la fase N1.

Fases 3 y 4 o fase N3: También llamado sueño de ondas lentas, es la fase más profunda de sueño no-MOR, donde el umbral para despertar es el más alto. Se caracteriza por oscilaciones de muy baja frecuencia en el EEG llamadas ondas delta (1-4 Hz).

Sueño MOR o fase R: Se caracteriza por la presencia de movimientos oculares rápidos, una pérdida generalizada del tono muscular esquelético (salvo músculos respiratorios y esfínteres), así como frecuencia cardíaca y respiratoria irregulares. También suele referirse a esta fase como sueño paradójico, puesto que la actividad cerebral se incrementa a niveles similares a los de la vigilia (predominando la actividad beta y theta) y es la etapa en la que se producen la mayoría de ensoñaciones. Al finalizar un periodo de sueño MOR el umbral para despertar es muy bajo. El fin de la etapa MOR se continúa con el inicio de una nueva fase N1.

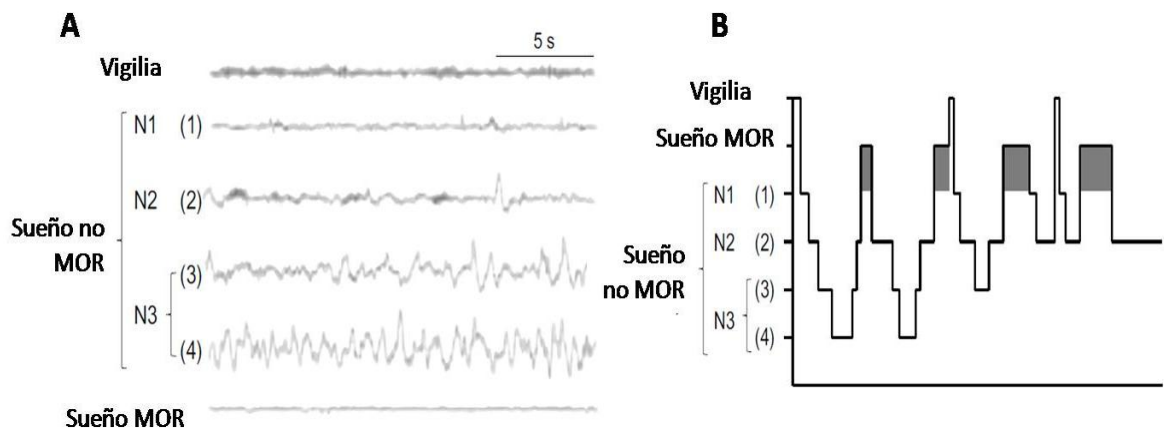


Figura 2. Caracterización electroencefalográfica del sueño. A) Frecuencia de ondas electroencefalográficas característica de las fases sueño y B) Esquematización de los cambios en el nivel de actividad electroencefalográfica durante las fases del sueño (modificada de Miyasaki et al., 2017).

Un ciclo completo de sueño no-MOR / MOR tiene una duración promedio de 1.5 h. Durante un periodo de sueño en el humano, típicamente ocurren cuatro o cinco ciclos completos (Vasalli y Dijk, 2009).

El ciclo de sueño-vigilia se controla mediante una interacción recíproca de tipo inhibitorio entre los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico, colinérgico, orexigénico y el sistema reticular activador ascendente, que en conjunto promueven la vigilia y las neuronas productoras de galanina y GABA del núcleo preóptico ventrolateral en el hipotálamo, que estimulan el sueño. Tal regulación establece un circuito de retroalimentación de tipo encendido - apagado responsable de la alternancia entre el sueño y la vigilia (Kumar y Chanana, 2014). Adicionalmente, se plantea que el área tegmental pontina del tronco encefálico y las regiones medulares y mesencefálicas adyacentes contienen neuronas implicadas en la generación y alternancia entre las fases de sueño (Lu et al., 2006; Weber et al., 2015; Hayashi et al., 2015).

1.2.2 Trastornos de sueño y alteraciones en la nocicepción

La reducción, fragmentación o privación total de sueño son condiciones en las que un individuo no duerme lo suficiente para mantener niveles normales de alerta durante el periodo de vigilia (American Academy of Sleep Medicine, 2014). La reducción se refiere a un acortamiento del tiempo de sueño por debajo de las necesidades fisiológicas, la fragmentación se refiere a un sueño interrumpido, mientras que la privación de sueño es un estado donde el organismo permanece despierto durante un período prolongado (Kumar y Chanana, 2014).

Datos epidemiológicos muestran que los trastornos de sueño son muy frecuentes en la sociedad moderna y existe una tendencia generalizada a disminuir el tiempo de sueño (Knutson et al., 2010; Schoenborn et al., 2013; Chattu et al., 2018). Asimismo, existe evidencia que muestra relación entre los trastornos del sueño y el desarrollo de varias alteraciones neuroconductuales, metabólicas, hormonales, neuroendocrinas e inmunes (Tufik et al., 2009; Kumar y Chanana, 2014; Irwin, 2015; Zhao et al., 2017).

Particularmente, existe una relación estrecha entre el sueño y el dolor. Por un lado, experimentar dolor perturba el sueño e impide su conciliación. Por el otro, se ha identificado que las alteraciones del sueño, como la irrupción de su continuidad, cambios en su arquitectura o privación, están frecuentemente asociadas a anomalías en la nocicepción y condiciones de dolor crónico, de forma tal que la relación entre el dolor y los trastornos del sueño se considera recíproca (Lautenbacher et al., 2006; Azevedo et al., 2011). Se han planteado diversos enfoques para estudiar la direccionalidad causal entre las alteraciones de la nocicepción y los trastornos del sueño. Uno de ellos propone que el dolor induce un incremento en la actividad de diversas estructuras del sistema nervioso, lo cual impide el inicio o la continuidad del sueño e induce somnolencia diurna (Smith y Haythornthwaite, 2004). Otra perspectiva plantea que la modulación del dolor y la regulación del sueño comparten mecanismos neurobiológicos comunes, en particular la transmisión serotoninérgica central (Foo y Mason, 2003), de tal forma que las alteraciones del sueño y la nocicepción pueden ser fenómenos secundarios a una disfunción común. Finalmente, estudios experimentales y observaciones clínicas donde se ha evaluado la relación temporal entre sueño y dolor, han dado pie a la hipótesis de que las alteraciones del sueño pueden ser parte de la etiología de alteraciones agudas y crónicas en la nocicepción (Kundermann et al., 2004; Lautenbacher et al., 2006; Simpson et al., 2018; Andersen et al., 2018).

Diversos reportes experimentales en humanos demuestran que la privación de sueño total (Schuh-Hofer et al., 2013; Larson y Carter, 2016; Krause et al., 2019), parcial (Faraut et al., 2015) o selectiva (Lentz et al., 1999; Roehrs et al., 2006) aumenta la percepción y reduce los umbrales del dolor ante estimulación eléctrica, mecánica y térmica. Además, se ha reportado que la privación de sueño puede interferir con tratamientos analgésicos que involucran mecanismos de acción opioidérgicos y serotoninérgicos (Onen et al., 2001a) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Estudios representativos en humanos sobre los efectos de la privación de sueño en el dolor (Modificada de Lautenbacher et al., 2006) (P-MOR: Privación de sueño MOR).

| Autor | Sujetos de estudio | Diseño experimental | Evaluación de la nocicepción | Resultados principales |
|-------------------------------------|---|--|---|---|
| Moldofsky et al., 1975 | Hombres sanos (n=6) | Estudio de medidas repetidas. Privación de sueño de ondas lentas por 3 días consecutivos. | Umbral de dolor ante estimulación mecánica (en 26 sitios sensibles en pacientes con fibromialgia). | Reducción de umbrales ante estimulación mecánica y síntomas de dolor musculoesquelético. |
| Moldofsky y Scarisbrick 1976 | Sujetos sanos (n=13, 12 hombres y una mujer) | Comparación entre dos grupos independientes: privación de sueño de ondas lentas vs. P-MOR por 3 noches consecutivas. | Valoraciones subjetivas de los sujetos de estudio y umbrales de dolor ante estimulación mecánica. | Menor umbral ante estimulación mecánica y mayor apreciación subjetiva de dolor musculoesquelético en el grupo con privación de sueño de ondas lentas que en el grupo con P-MOR. |
| Lentz et al., 1999 | Mujeres sanas (n=12) | Privación de sueño de ondas lentas por 3 días consecutivos. | Detección de umbrales de dolor ante estimulación mecánica y térmica y valoraciones subjetivas de los sujetos de estudio. | Reducción de umbrales de dolor a partir del segundo día de privación de sueño. Mayor apreciación subjetiva de dolor musculoesquelético tras el tercer día de privación de sueño. |
| Onen et al., 2001a | Hombres sanos (n=9) | Privación total de sueño por una noche seguida de dos noches de privación de sueño de ondas lentas o P-MOR. | Detección de umbrales de dolor ante estimulación térmica y mecánica. | Reducción del umbral ante la estimulación mecánica tras la primera noche de privación total de sueño y tras las noches subsiguientes de privación de sueño de ondas lentas. |
| Kundermann et al., 2004 | Sujetos sanos (n=20) | Privación total de sueño por 2 noches con intervalo de 2 días. | Detección de umbrales de dolor ante estimulación térmica. | Reducción de los umbrales ante estimulación por calor y por frío tras la privación de sueño. |
| Roehrs et al., 2006 | Sujetos sanos (n=13, 10 mujeres y 3 hombres) | Dos diseños de medidas repetidas, un grupo en condiciones de restricción de sueño y un grupo con P-MOR. | Latencia de retiro del dedo ante estímulo con radiación caliente. | Reducción del umbral de retiro ante estimulación térmica inducido por la restricción de sueño y la P-MOR |
| Azevedo et al., 2011 | Hombre sanos (n=28) | Privación total de sueño por 2 noches y P-MOR por 4 noches consecutivas. | Determinación con EEG del umbral de potencial evocado con láser y escala analógica visual subjetiva. | Aumento de la percepción subjetiva de dolor y aumento del umbral evocado con láser en el grupo con privación total de sueño pero no en el grupo con P-MOR. |
| Schuh-Hofer et al. 2013 | Sujetos sanos (n=14, 8 hombres y 6 mujeres) | Privación total de sueño por una noche. | Detección de umbrales de dolor ante estimulación térmica y mecánica. Evaluación de somnolencia y ansiedad tras el periodo de privación de sueño. | Inducción de hiperalgesia generalizada, aumentó el estado de somnolencia y ansiedad. |
| Larson y Carter 2016 | Sujetos sanos (n=27, 14 hombres y 13 mujeres) | Privación total de sueño por una noche. | Prueba de 2 minutos mediante inmersión de la mano en agua helada (1°C). Evaluación cada 15s de la percepción subjetiva del dolor con escala de Borg modificada. | Aumento de la percepción del dolor ante un estímulo frío, sin diferencias entre sexos. |
| Simpson et al. 2018 | 16 sujetos sanos (8 hombres, 8 mujeres) | Restricción crónica de sueño (5 noches con 4 h de sueño seguidas de 2 noches con 8 h de sueño durante 3 semanas). | Evaluación de reportes de dolor espontáneo y determinación de umbrales ante estimulación térmica. | Aumento en los reportes de dolor espontáneo, disminución de los umbrales térmicos al calor y ante el frío durante las semanas 2 y 3. |
| Krause et al. 2019 | 25 sujetos sanos | Estudio de medidas repetidas en condiciones control y en condiciones de privación total de sueño por una noche. | Detección de umbrales ante estimulación térmica caliente. Evaluación por resonancia magnética funcional durante la realización de una prueba de umbral térmico. | Reducción del umbral a los estímulos térmicos. Aumento de la reactividad de la corteza somato sensorial primaria y reducción de la reactividad del tálamo, núcleo accumbens e ínsula ante la estimulación térmica nociva. |

De manera paralela, los experimentos de reducción o privación de sueño en modelos animales muestran que tales condiciones exacerban las conductas nociceptivas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Estudios representativos en modelos animales sobre los efectos de la privación de sueño en el dolor (modificada de Lautenbacher et al., 2006) (P-MOR: Privación de sueño MOR).

| Autor | Sujetos de estudio | Diseño experimental | Evaluación de la nocicepción | Resultados principales |
|----------------------------------|---|--|---|--|
| Hicks et al. 1978 | Ratas Sprague Dawley (n=36) | P-MOR durante 1, 2 o 3 días consecutivos. | Estimulación eléctrica en la cola. | Reducción del umbral de dolor ante estimulación eléctrica independientemente de la duración de P-MOR. |
| Hicks et al. 1979 | Ratas Wistar (n=210) | P-MOR por 4 días consecutivos. | Estimulación eléctrica en la cola. | Reducción del umbral de dolor ante estimulación eléctrica a partir del día 1 de P-MOR. |
| Ukponmwan et al., 1984 | Ratas Wistar (n=210) | P-MOR por 4 días consecutivos, con o sin estrés previo. | Umbral nociceptivo mecánico (presión en la pata). | Reducción del umbral de retiro mecánico. Fosforamidona y morfina sin efecto antinociceptivo en el grupo con P-MOR, pero sí en el grupo con estrés + P-MOR. |
| Ukponmwan et al., 1986 | Ratas Wistar (n=171) | P-MOR por 4 días consecutivos. Postratamiento con deprenil, feniletilamina o fosforamidona. | Umbral nociceptivo mecánico (presión en la pata). | Reducción del umbral de retiro mecánico. Feniletilamina y deprenil potenciaron el efecto de la fosforamidona en animales control, pero no en los sometidos a P-MOR. |
| Onen et al., 2000 | Ratas Wistar (n=16) | P-MOR por 3 días consecutivos. | Umbral nociceptivo mecánico (presión en la pata). | Disminución del umbral mecánico tras 48 y 72 h de P-MOR. La recuperación con sueño libre restableció el umbral. |
| Onen et al., 2001b | Ratas Wistar (n=64) | P-MOR por 3 días consecutivos. | Inmersión de cola en agua caliente, presión en la pata, vocalización ante estimulación eléctrica y prueba de formalina. | Reducción de los umbrales ante la estimulación térmica, mecánica y eléctrica. Sin diferencias en la prueba de formalina entre los grupos control y sometido a P-MOR. |
| Wei et al., 2008 | Ratas Hannover-Wistar macho (n= no reportada) | P-MOR durante 48 h y prueba de fármacos serotoninérgicos. | Umbral nociceptivo mecánico (Filamentos de von Frey). | Reducción de los umbrales de retiro ante estimulación mecánica tras 24 y 48 h de P-MOR. La sensibilidad mecánica en los animales control se redujo tras la administración intratecal de antagonistas de receptores 5-HT1A y 5-HT2C; mientras que, en los animales con P-MOR, un agonista y un antagonista de receptores 5-HT1A tuvieron efecto antinociceptivo. |
| Harvey et al. 2010 | Ratas Sprague Dawley macho (n=6) | P-MOR durante 48 h. | Test de preferencia térmica (estímulos calientes y fríos). | Incremento de la sensibilidad ante estímulos fríos. |
| Tomim et al., 2016 | Ratas Wistar macho (n= no reportada) | P-MOR durante 48 h. Efectos de morfina, bicuculina y agonistas o antagonistas del receptor para colecistocinina 2CCK2). | Nocicepción inducida por formalina. Umbral nociceptivo mecánico (Filamentos de von Frey). | Aumento de conductas nociceptivas inducidas por formalina y disminución del umbral de retiro a partir de 24 h de P-MOR. La bicuculina tuvo efecto antinociceptivo en ratas control pero no en ratas con P-MOR. El antagonista de CCK2 disminuyó las conductas nociceptivas en ratas con P-MOR pero no en animales control; mientras que, el agonista de CCK2 tuvo efecto pronociceptivo en ratas control pero no en ratas con P-MOR. |
| Latremoliere et al., 2017 | Ratones C57BL/6J machos y hembras | Privación total de sueño (durante 6, 9 o 12 h) vs. restricción crónica de sueño (6 h diarias durante 5 días) vs fragmentación de sueño durante 5 días. | Pruebas de von Frey, de acetona, de cepillo, de placa caliente y capsaicina intraplantar. | La privación total y la restricción crónica, pero no la fragmentación del sueño en ratones sanos, aumenta la sensibilidad a los estímulos nocivos. Cafeína y modafinilo normalizaron la sensibilidad al dolor. |

Los mecanismos implicados en el desarrollo de hiperalgesia a consecuencia de trastornos del sueño se conocen parcialmente (Sardi et al., 2018). Los principales sistemas de neurotransmisión involucrados en la desregulación central presente en trastornos de sueño que se acompañan de hipersensibilidad al dolor son los monoaminérgicos y opioidérgicos (Finan et al., 2013). Estudios de imagenología cerebral en pacientes con diagnóstico de insomnio muestran hiperactividad en áreas cortico-límbicas implicadas en el mantenimiento de la vigilia y reguladas por vías monoaminérgicas; mientras que estas mismas áreas se han implicado en la fisiopatología de algunas condiciones de dolor crónico (Riemann et al., 2015; Sluka y Clauw, 2016).

También existe evidencia de que las alteraciones en los sistemas de modulación endógenos del dolor participan en la hipersensibilidad inducida por falta de sueño. Por ejemplo, Roehrs y colaboradores (2006) identificaron que la fragmentación de sueño altera la función del sistema endógeno inhibitorio descendente y favorece el desarrollo de dolor espontáneo. También se ha reportado que la privación de sueño MOR reduce los efectos analgésicos de opioides endógenos y exógenos (Onen et al., 2001b). Aunado a ello, se han identificado niveles reducidos de serotonina y su principal metabolito, el ácido 5-hidroxitriptamina, en diferentes áreas del cerebro de ratas después de 96 h de privación de sueño MOR (Farooqui et al., 1996). La hiperalgesia mecánica presente en ratas con privación de sueño MOR se ha asociado a un aumento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en la sustancia gris periacueductal dorsolateral, lo que tiene efecto negativo sobre la funcionalidad de las vías inhibitorias descendentes (Damasceno et al., 2013).

Por otra parte, se ha identificado en humanos un aumento en la secreción de prostaglandinas, especialmente la prostaglandina E₂ (PGE₂) y la manifestación de dolor espontáneo (dolor de cabeza, dolor muscular, dolor corporal generalizado) tras la privación total de sueño (Haack et al., 2009). Otro posible mecanismo que relaciona los trastornos de sueño con hiperalgesia es el aumento del estrés oxidativo a nivel de la médula espinal, ya que la administración de agentes

antioxidantes por vía intratecal ha mostrado tener efecto antinociceptivo después de la privación de sueño MOR (Wei et al., 2011).

Finalmente, un número creciente de estudios sugieren que la activación glial aberrante participa en el desarrollo y / o mantenimiento de la sensibilización central e hiperalgesia (Austin y Moalem-Taylor, 2010; Loggia et al., 2015; Bjurstrom et al., 2016). La sobre activación glial conduce a un estado neuroinflamatorio que se caracteriza por niveles altos del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), los cuales aumentan la excitabilidad de neuronas del sistema nervioso central a través de mecanismos como la potenciación a largo plazo y aumento de la eficiencia sináptica (Ferrini y De Koninck, 2013). Asimismo, hay evidencias de que el estrés agudo severo, el estrés crónico y la falta de sueño pueden desencadenar la sobreactivación de la glía y un posterior estado neuroinflamatorio que induce hipersensibilidad al dolor (Nijs et al., 2017; Afolalu et al., 2018).

1.3 Receptor TLR4

Los receptores tipo Toll (*Toll like receptors* o TLR) son una familia de receptores que regulan respuestas inmunes innatas y adaptativas tras la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por las siglas en inglés de *patogen associated molecular patterns*), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por las siglas en inglés de *damage associated molecular patterns*) o xenobióticos (Takeda et al., 2003; Takeuchi y Akira, 2010, Liu et al., 2012).

La familia de receptores TLR tiene una estructura altamente conservada. Su dominio extracelular es rico en repeticiones de leucina y está implicado tanto en la dimerización de las subunidades del receptor como reconocimiento de diversos DAMPs y PAMPs. Dentro de los principales ligandos del receptor tipo Toll 4 (TLR4) se encuentran el lipopolisacarido (LPS), un componente abundante de la membrana externa de bacterias gram negativas, las proteínas de choque térmico (*Heat-shock proteins* o HSPs), los productos de la degradación de la matriz extracelular y la proteína HMGB1 (*High mobility group box-1*). Adicionalmente, el

estudio de los componentes bacterianos capaces de interactuar con el TLR4 ha arrojado que al menos dos formas naturales de lipopolisacárido antagonizan al receptor en lugar de activarlo: el LPS de *Larsonella quintana* y el de *Rhodobacter sphaeroides* (Gaikwad y Agrawal-Rajput, 2015; Malgorzata-Miller et al., 2016). Por su parte, el dominio intracelular TIR (de *Toll/IL-1R homologous region*) es responsable del acoplamiento del receptor con los componentes moleculares de las vías transduccionales que activa (Park y Lee, 2013).

El receptor TLR4 se ubica tanto en la membrana plasmática como en vesículas endosómicas (Kagan et al., 2008) de células presentadoras de antígenos como los macrófagos, células dendríticas y células B (Akashi et al., 2000; Gondokaryono et al., 2007; Huang et al., 2007). También se ha reportado su expresión en células endoteliales, miocitos, células endometriales, fibroblastos, células foliculares tiroideas y células β pancreáticas (Garay-Malpartida et al., 2011). Dentro del sistema nervioso, el TLR4 está presente en los macrófagos residentes, células de la microglía, astrocitos y neuronas aferentes primarias que expresan TRPV1 y CGRP (Wadachi y Hargreaves, 2006; Barajon et al., 2009; Vaure y Liu, 2014).

1.3.1 Activación y señalización canónica del TLR4

La unión de ligandos a los dominios ricos en leucina del TLR4 induce el acoplamiento de dos unidades monoméricas del receptor mediante su interacción a través de proteínas co-receptoras: el receptor de diferenciación mieloide 2 (MD-2) y el grupo de diferenciación 14 (CD14) (Sanui et al., 2017). La dimerización permite la interacción entre los dominios TIR intracelulares, y ello a su vez activa el reclutamiento de proteínas adaptadoras hacia los dominios TIR (Chen et al., 2018). La activación del TLR4 estimula dos vías de transducción principales (**Figura 3**) que se activan de forma diferencial dependiendo si el ligando activador es un DAMP o un PAMP (Peri y Calabrese, 2014). La activación por PAMPs requiere la participación de MD-2, induce la dimerización del TLR4 en la membrana plasmática y activa la vía de señalización dependiente de MYD88 (proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88), que culmina con

una activación temprana del factor de transcripción NF- κ B, la producción de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1, IL-2 e IL-6), quimiocinas (CCL2 y CXCL8) y activación de la proteína cinasa C (PKC). Por su parte, la activación del TLR4 con DAMPs requiere la participación del correceptor CD14, induce la dimerización e internalización del TLR4 y la activación de la vía dependiente de TRIF/TRAM, que promueve la activación del factor de transcripción IRF-3 (factor de respuesta al interferón 3) la subsecuente síntesis de interferones tipo I (INF α e INF β), así como la activación tardía de NF- κ B y la ulterior producción de las citocinas proinflamatorias antes señaladas, implicadas en los procesos de sensibilización periférica y central (Gangloff, 2012; Kawasaki y Kawai, 2014; Roy et al., 2016).

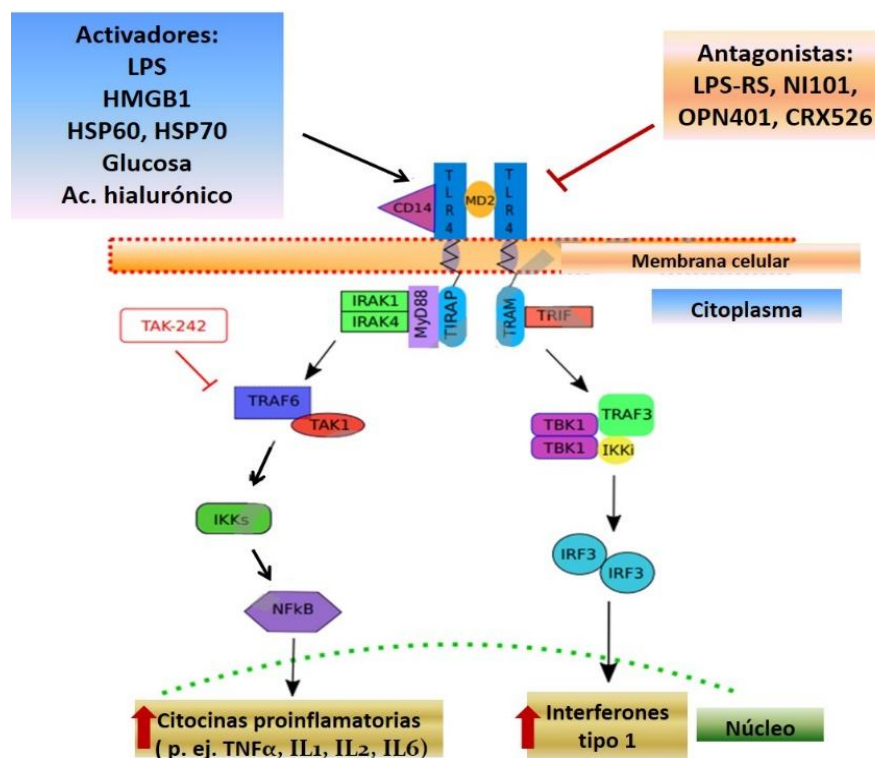


Figura 3. Vías de transducción canónicas acopladas al receptor TLR4. La vía dependiente de MYD88 culmina río abajo con la activación del factor de transcripción NF- κ B y el consecuente aumento en la síntesis de citocinas proinflamatorias; mientras que la vía dependiente de TRIF culmina en la activación del factor de transcripción IRF3 y el consecuente aumento en la síntesis de interferones (modificado de Bruno et al., 2018).

1.4 Proteína HMGB1

Matzinger (2002) postuló la llamada “*teoría del peligro*” en la cual plantea que el sistema inmunológico no solo responde a agentes patógenos, sino que es capaz de responder a señales que surgen de la necrosis de células sanas a consecuencia de inflamación, isquemia o hipoxia. A estas señales moleculares endógenas liberadas por las células dañadas o sometidas a estrés se les denomina alarminas o DAMPs (Bianchi, 2007; Chan et al., 2012). Los DAMPs comprenden un conjunto de moléculas multifuncionales que comunican al organismo la presencia de daño tisular y promueven respuestas inmunes innatas y adaptativas importantes para la activación de mecanismos de reparación. En condiciones fisiológicas, los DAMPs suelen desempeñar diversas funciones en el medio intracelular, pero ante el daño o la muerte celular son liberadas al espacio extracelular, donde pueden activar a sus receptores correspondientes (Tabla 3). Algunos DAMPs se liberan activamente al espacio extracelular por leucocitos y otras células en respuesta a la presencia de componentes moleculares provenientes de microorganismos patógenos (PAMPs), citocinas o estrés celular (Keller et al., 2008).

Tabla 3. Principales patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y receptores sobre los cuales tienen actividad (modificada de Kato y Svensson, 2015).

| DAMPs (moléculas citoplasmáticas o nucleares) | Receptores que activa |
|---|---|
| HMGB1 | TLR2, TLR4, TLR9, CD24, RAGE, Siglec, Mac-1 |
| Proteínas S100 | RAGE, TLR4 |
| Proteínas de choque térmico (HSPs) | TLR2, TLR4, CD40, CD91 |
| Histonas | TLR9 |
| RNAs | TLR3, TLR7 |
| Metabolitos de purina (ATP, ácido úrico) | P1, P2X, P2Y, NLRP3, TLR2, TLR4 |
| Proteína β -amiloide | RAGE, NLRP3 |
| DAMPs (proteínas de la matriz extracelular) | |
| Proteoglicanos (p. ej. ácido hialurónico) | TLR2, TLR4, NLRP3 |
| Sulfato de heparano | TLR4 |
| Fibrinógeno | TLR4 |
| Fibronectina | TLR4 |

HMGB1 es una proteína nuclear de unión al ADN que se expresa de forma ubicua y que junto con las histonas participa en la regulación de la replicación, reparación, recombinación y transcripción del ADN, así como en el arreglo estructural de la cromatina (Ueda y Yoshida, 2010). HMGB1 consta de una secuencia de 215 aminoácidos y tiene un peso de 25 KDa. Contiene dos dominios de unión al ADN cargados positivamente denominados cajas A y B, la última de ellas está implicada en la señalización extracelular y su unión a receptores; en tanto que el extremo carboxilo está cargado negativamente (Weir et al., 1993; Andersson et al., 2002).

Diversos estímulos como la invasión por patógenos, las lesiones tisulares y la inflamación se han identificado como factores que promueven la secreción de HMGB1 al medio extracelular tanto de forma pasiva como activa (Andersson y Tracey, 2011). La secreción pasiva ocurre de forma rápida en cualquier tipo celular tras el aumento en la permeabilidad membranal que acompaña a la muerte no apoptótica, por lo que HMGB1 se considera un marcador primario de daño tisular. Por su parte, la secreción activa de HMGB1 se ha descrito en células con funciones inmunes como los monocitos activados, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células dendríticas y células NK, (Wang et al., 1999; Rouhiainen et al., 2000; Dumitriu et al., 2005; Semino et al., 2005) y más recientemente en células del sistema nervioso como los astrocitos, microglia y neuronas (Kang et al., 2014). La secreción activa es un proceso regulado por la actividad de receptores de membrana y su activación por ligandos extracelulares (Gardella et al., 2002). Se han identificado a sustancias como el LPS, IL-1, TNF α , INF γ y neuropéptido Y como promotores de su secreción (Rendon-Mitchell et al., 2003; Jiang y Pisetsky, 2006; Zhou et al., 2013).

Una vez presente en el medio extracelular, la proteína HMGB1 se considera una citocina que actúa sobre diferentes tipos de células a través de su unión con varios tipos de receptores (**Figura 4**) entre los que se han identificado al TLR2, TLR4, TLR9, RAGE (de receptor *for advanced glycation end products*), CD24, Siglec-10 y Mac-1 (Hori et al., 1995; Park et al., 2004; Ivanov et al., 2007; Orlova et al., 2007; Chen et al., 2009); a través de los cuales participa en procesos como la activación

de respuestas inmunes innatas y adaptativas, la inducción de la síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias, quimiotaxis, así como diferenciación y proliferación celular (Andersson y Tracey, 2011). La capacidad de unión de HMGB1 con los diferentes receptores a los que puede activar depende en parte de su estado redox. HMGB1 posee en su estructura 3 aminoácidos cisteína en las posiciones 23, 45 y 106 (Yang et al., 2012). Cuando los 3 residuos de cisteína se encuentran reducidos (HMGB1 tiol) tiene capacidad de acoplarse a los receptores RAGE y promover actividad quimiotáctica (Venereau et al., 2012). Cuando las cisteínas 23 y 45 están ligadas por un puente disulfuro y la cisteína 106 está en forma reducida (HMGB1 disulfuro) funge como ligando para el receptor TLR4 y promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias (Yang et al., 2010b). También se ha descrito que HMGB1 puede formar complejos con diferentes moléculas como el LPS, IL-1, ADN bacteriano, ARN viral, y la quimiocina CXCL12, potenciando las respectivas acciones de tales compuestos al unirse a sus receptores (Sha et al., 2008, Campana et al., 2009).

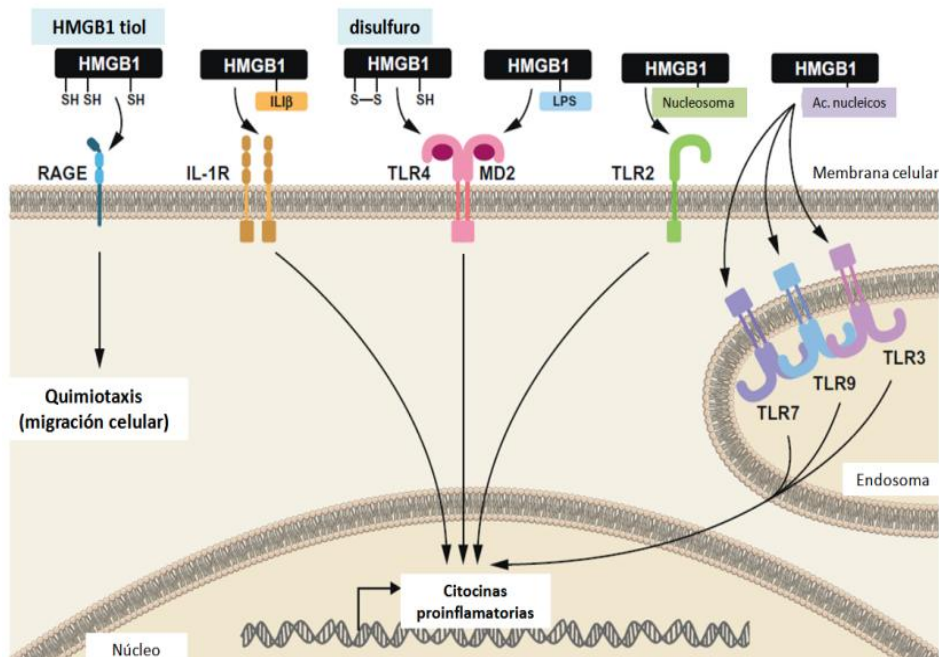


Figura 4. Receptores de la alarmina HMGB1. Dependiendo de su estado redox o la formación de complejos con otras moléculas señalizadoras, HMGB1 tiene actividad sobre varios tipos de receptores y participa en la regulación de la síntesis de citocinas proinflamatorias, migración, proliferación y diferenciación celular (modificada de Kato y Svensson, 2015).

1.5 Participación del receptor TLR4 en el dolor

La activación del TLR4 tiene un papel importante en la protección del organismo al inducir respuestas inmunes encaminadas a combatir estados infecciosos y reparar daño en tejidos. Sin embargo, la sobre activación del TLR4 y otros miembros de la familia TLR conduce a una producción sostenida de mediadores proinflamatorios (Gao et al., 2017) que contribuyen al desarrollo de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y diferentes tipos de dolor patológico (Mohammad-Hosseini et al., 2015).

Existe una interacción estrecha entre las neuronas implicadas en la nocicepción, las células gliales y las células del sistema inmune que se infiltran al sistema nervioso central desde la periferia. Las células gliales residentes del sistema nervioso, así como los macrófagos, células cebadas y neutrófilos sintetizan y secretan varios mediadores proinflamatorios como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ y BDNF que pueden estimular directamente o bien, sensibilizar a los nociceptores. El aumento en la síntesis de citocinas proinflamatorias se ha asociado al reforzamiento de la transmisión excitatoria y atenuación de la transmisión inhibitoria a nivel medular, lo cual conduce al desarrollo de hipersensibilidad al dolor (Pinho-Ribeiro et al., 2017; Meng et al., 2017).

Existe evidencia sobre la participación del receptor TLR4 en el desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad al dolor en modelos de dolor inflamatorio, neuropático y oncológico, ya sea a través de su activación en células con función inmune o directamente sobre la membrana de los nociceptores (Li et al., 2015a; Li et al., 2015b; Jurga et al., 2016; Meng et al., 2017; Min et al., 2018; Wu et al., 2019). Se sabe que la activación del receptor TLR4 microglial participa en el desarrollo de hipersensibilidad al dolor en la neuropatía inducida por la lesión de nervios espinales en ratas y ratones. Se ha reportado que ratones TLR4-KO y ratas en las que se bloqueó la expresión del TLR4, desarrollaron menos hipersensibilidad al dolor y mostraron menor expresión de marcadores de activación microglial y citocinas proinflamatorias ($TNF\alpha$, $IL1-\beta$, $IFN\gamma$) comparados con sus grupos control (Tanga et al., 2005). Resultados similares se han descrito

en un modelo de dolor crónico inducido por artritis, en el que la administración intratecal de LPS-RS, un antagonista del receptor TLR4, tuvo efecto antinociceptivo, mientras que los ratones TLR4-KO presentaron menor activación microglial comparados con sus controles tipo silvestre (Christianson et al., 2011).

Adicionalmente, existe posibilidad de que el TLR4 participe en la modulación del dolor a través de efectos directos en neuronas nociceptoras, puesto que se ha descrito coexpresión de TLR4, otros TLRs (TLR3, TLR7) y canales iónicos pronociceptivos como el TRPV1 en subconjuntos de nociceptores (Liu et al., 2010; Liu et al., 2012).

1.6 Participación de HMGB1 en el dolor

Se ha reportado que neuronas, células satélites, células de Schwann, microglía y astrocitos de ratas y ratones intactos muestran inmunorreactividad a HMGB1, de tal forma que cualquiera de esos tipos celulares puede ser fuente de HMGB1 en el sistema nervioso (Shibasaki et al., 2010; Tanaka et al., 2013; Agalave et al. 2014).

Diversos estudios han identificado un efecto pronociceptivo de la proteína HMGB1. Chacur y colaboradores (2001) desarrollaron un modelo de neuritis del nervio ciático en ratas mediante activación inmune, en el cual reportaron que la administración perineural de HMGB1 redujo los umbrales de retiro ante la estimulación mecánica. Además, la administración de HMGB1 por vía intratecal también reduce el umbral de retiro a estímulos mecánicos en ratas (O'Connor et al., 2003). Por otra parte, se ha reportado que la ligadura de nervios espinales en ratas aumenta la expresión de HMGB1 en neuronas aferentes primarias, células satélites del ganglio de la raíz dorsal y células de Schwann (Shibasaki et al., 2010). En otro estudio, Tanaka y colaboradores (2013) identificaron que la administración intraplantar de HMGB1 en ratas produce un estado transitorio de hipersensibilidad térmica y mecánica. Estos estudios sustentan que los efectos pronociceptivos de HMGB1 ocurren tanto a nivel periférico como central.

Algunos estudios han mostrado que la irrupción de la función de HMGB1 tiene efecto antinociceptivo en modelos animales. Por ejemplo, se ha reportado que la hipersensibilidad mecánica inducida por ligadura de nervios espinales L4 y L5 (Shibasaki et al., 2010), por ligadura parcial del nervio ciático (Nakamura et al., 2013), por inyección intraplantar de LPS (Tanaka et al., 2013), el dolor asociado a cáncer de hueso (Tong et al., 2010), neuropatía diabética (Ren et al., 2012), artritis reumatoide (Agalave et al., 2014) y dolor inflamatorio vesical (Tanaka et al., 2014) se atenúa mediante la administración sistémica o local de anticuerpos capaces de neutralizar a HMGB1.

De forma similar, la administración de glicirricina, un terpeno natural derivado de la planta del regaliz *Glycyrrhiza glabra*, capaz de unirse a las cajas A y B de HMGB1 y por tanto impedir su unión a receptores sin interferir su capacidad de unión al ADN (Mollica et al., 2007), tiene efecto antinociceptivo en modelos de dolor neuropático (Feldman et al., 2012), artrítico (Agalave et al., 2014) e inflamatorio crónico (Sun et al., 2018). Por otra parte, la administración de trombomodulina, una proteína endotelial con actividad anticoagulante y capaz de degradar a la HMGB1 extracelular, tiene efecto antinociceptivo en modelos de dolor inducido por inyección intraplantar de LPS, HMGB1 y dolor inflamatorio vesical (Tanaka et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Sun et al., 2018).

1.7 Canal TRPV1

La capacidad de los nociceptores para detectar estímulos nocivos depende de la expresión de varios tipos de receptores y canales iónicos en su membrana plasmática, responsables de los mecanismos moleculares de la transducción sensorial. El grupo más grande de canales iónicos implicados en la nocicepción es la familia de canales TRP (de *Transient Receptor Potential*) (Clapham, 2003; Patapoutian et al., 2009). Los TRP se expresan a nivel de la membrana plasmática y en la membrana de varios organelos intracelulares, donde participan en la regulación de las concentraciones intracelulares de iones Ca^{2+} , Na^+ y Mg^{2+} (Fleig y Penner, 2004; Salido et al., 2009; Zhao y Tsang, 2017). La familia de los TRP

cuenta con al menos 28 miembros identificados en mamíferos que median una gran diversidad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Jardin et al., 2017). En la actualidad los TRP se clasifican en siete familias: TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPA y TRPN, cada una de las cuales incluye uno o más miembros (Li et al., 2011).

El receptor TRPV1 es un canal catiónico no selectivo que se expresa ampliamente en el sistema nervioso periférico, principalmente en neuronas nociceptoras de los ganglios de la raíz dorsal, ganglio trigeminal, ganglio nodal y ganglios simpáticos (Guo et al., 1999). Está presente en fibras tipo C peptidérgicas y no peptidérgicas y en algunas fibras A δ , tanto en las ramas periféricas como en las centrales del axón (Caterina y Julius, 2001; Carlton y Coggeshall, 2001; Valtschanoff et al., 2001; Hwang et al., 2005; Cavanaugh et al., 2009; Huang et al., 2012). Su activación en las terminales periféricas de los nociceptores genera corrientes entrantes de Na⁺ y Ca²⁺ que provocan despolarización, la cual puede tener la suficiente magnitud para alcanzar el umbral de activación de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) e inducir el desarrollo de potenciales de acción que se propagan por el axón de los nociceptores hacia el sistema nervioso central (Gees et al., 2010).

El TRPV1 también se expresa en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal, tanto presinápticamente como postsinápticamente (Guo et al., 1999; Valtschanoff et al., 2001) donde modula la transmisión de las señales nociceptivas (Spicarova y Palecek, 2009). También se asume su expresión en neuronas medulares de amplio rango dinámico puesto que la administración espinal de capsazepina (antagonista del TRPV1) inhibe la actividad evocada de este tipo de neuronas medulares (Kelly y Chapman, 2002). Por último, se ha reportado su expresión en algunas áreas del encéfalo como el tallo, el núcleo caudado, el núcleo ambiguo, el bulbo olfatorio y el núcleo parabraquial (Cavanaugh et al., 2011).

1.7.1 Estructura del canal TRPV1

El receptor TRPV1 funcional es un homotetrámero que forma un canal permeable a Ca^{2+} y Na^+ (Bevan et al., 2014). Cada una de las subunidades del TRPV1 está formada por seis dominios transmembranales, con una región de poro hidrófoba entre los dominios 5-6 y con extremos carboxilo y amino terminal intracelulares (Ho et al., 2012; Cao et al., 2013) (**Figura 5**).

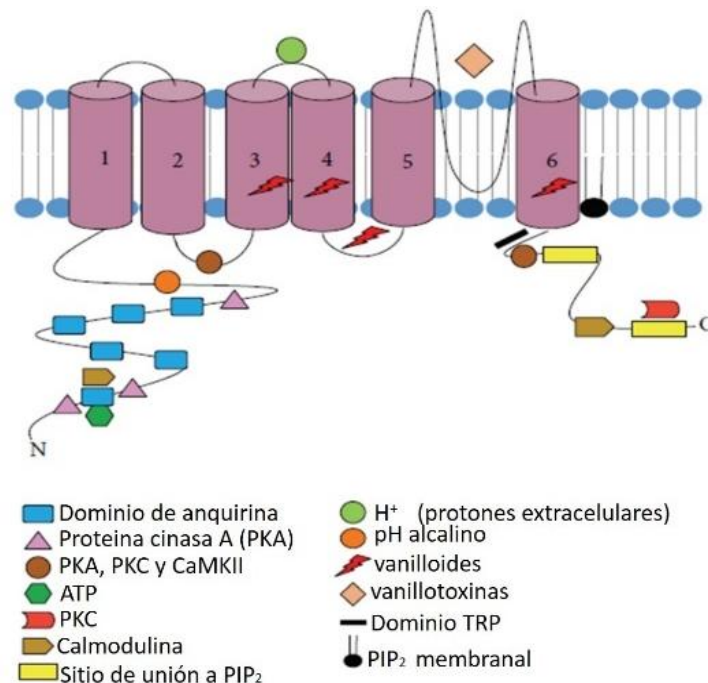


Figura 5. Representación esquemática de una subunidad monomérica del receptor TRPV1. Se señalan los sitios de unión de los diversos ligandos intra y extracelulares que regulan la actividad del canal y el transporte iónico a través de él (modificado de Smutzer y Devassy, 2016).

Cada subunidad contiene en su extremo amino terminal seis repeticiones de anquirina consecutivas que participan en interacciones proteína-proteína. Esta región del receptor contiene sitios consenso de fosforilación para proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de Ca^{2+} / calmodulina (CaMKII) y sitios regulados por calmodulina y ATP, que en conjunto modulan el umbral de activación del receptor (Moiseenkova-Bell et al., 2008). El dominio transmembranal 5, adjunto a la región del poro, es necesario para la activación del canal por protones, calor y fármacos como el cloroformo e isoflurano (Yang et al.,

2010a; Kimball et al., 2015). El dominio transmembranal 6 se continúa con el extremo carboxilo terminal, que contiene la “caja TRP”, un dominio de 25 aminoácidos necesario para la activación alostérica del canal y la formación de homotetrámeros. El extremo carboxilo terminal también contiene varios sitios de interacción con ligandos citosólicos, como los dominios de unión a fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂), calmodulina y PKC (Numazaki et al., 2002).

1.7.2 Agentes activadores y regulación de la actividad del TRPV1

El TRPV1 es un canal polimodal que participa en la detección de estímulos de naturaleza física y química. Es un canal termosensible (Caterina et al., 1997) con umbral de activación de aproximadamente 43°C y por lo tanto participa en la detección de calor nocivo (Tominaga et al., 1998). El TRPV1 se activa directamente por los protones libres cuando el pH se acidifica (<6), mientras que a pH en rango de 6 a 9 los protones actúan como un modulador, sensibilizando al canal a otros estímulos (Tominaga et al., 1998; Szallasi y Blumberg, 1999; Jordt et al., 2000). También presenta una ligera dependencia al voltaje (Vlachova et al., 2003); mientras que su fosforilación induce mayor sensibilidad a estímulos químicos y térmicos (Vellani et al., 2010; Smutzer y Devassy, 2016).

Múltiples ligandos endógenos y exógenos pueden activar al TRPV1. Los endovanilloides como el leucotrieno B₄, el 12-S-HPETE (12-s-ácido hidroperoxieicosatetraenoico) y la anandamida (Di Marzo et al., 2002; Hermann et al., 2003), son algunos de sus principales activadores endógenos. Los segundos mensajeros IP₃ y DAG estimulan la función del canal TRPV1 (Morales-Lázaro et al., 2013), el primero mediante la estimulación de liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico, mientras que el DAG funge como un agonista parcial del TRPV1 (Woo et al., 2008) y favorece la activación de la cinasa PKC que reduce el umbral de activación del TRPV1 (Moiseenkova-Bell et al., 2008). Por su parte el PIP₂, precursor de los segundos mensajeros mencionados, tiene la capacidad de unirse al extremo C-terminal y regular positivamente la actividad del canal (Brauchi et al., 2007). Por otra parte, la capsaicina (Caterina et al., 1997), resiniferanoides,

dialdehídos α , β -insaturados, ginsenósidos derivados del *Panax ginseng* (Jung et al., 2001) y cannabinoides (Bisogno et al., 2001) se han identificado como agonistas exógenos del canal (**Tabla 4**).

Tabla 4. Agonistas y antagonistas del receptor TRPV1. (CE₅₀: concentración efectiva 50; CI₅₀: concentración inhibitora 50) (Modificada de Jardín et al., 2017).

| Agonistas | | Antagonistas | |
|------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Nombre | Potencia (CE ₅₀) | Nombre | Potencia (CI ₅₀) |
| Capsaicina | 0.04-1 μ M | Agatoxina 489 | 0.3 μ M |
| Eugenol | 1 mM | Agatoxina 505 | 0.3 μ M |
| Resiniferatoxina | 39 nM | APHC1 | 54 nM |
| Poligodial | 5 μ M | Capsazepina | 420 nM |
| Cinnamodial | 0.6 μ M | Nicotina | 1 nM |
| Isovellaral | 100 nM | Yohimbina | 25 μ M |
| Canabidiol | 3 μ M | Ac. acetilsalicílico | 1 μ M |
| Ginsenósido Rc | No determinada | Grifolina | 26 μ M |
| VaTx1 | 12 μ M | Neogrifolina | 7 μ M |
| VaTx2 | 3 μ M | Albaconol | 17 μ M |
| VaTx3 | 0.3 μ M | BCTC | 35 nM |
| Leucotrieno B4 | 30 μ M | AMG-517 | 32 nM |
| 12-s-HPETE | 10 μ M | SB366791 | 651 nM |
| Anandamida | 30 μ M | A784168 | 25 nM |

La exposición persistente a algunos agentes activadores del TRPV1 induce un estado de desensibilización que atenúa progresivamente la capacidad de respuesta del canal a estímulos subsecuentes. Tal fenómeno depende principalmente de un mecanismo de desfosforilación (Lishko et al., 2007) en el cual participa la calcineurina fosfatasa (Mohapatra y Nau, 2005). Se han descrito otros mecanismos implicados en la desensibilización, como la unión de complejos calcio-calmodulina (CaM) que impiden la activación del canal (Lau et al., 2012), la hidrólisis del PIP₂ y la degradación de PKA que en condiciones basales ejercen cierto grado de activación sobre el canal (Yao y Qin, 2009; Sanz-Salvador et al., 2012) y la endocitosis de TRPV1, principal mecanismo que induce desensibilización a largo plazo (Ferrándiz-Huertas et al., 2014).

Algunos mediadores inflamatorios regulan la expresión membranal del TRPV1. Un ejemplo bien estudiado es el factor de crecimiento neuronal (NGF) que induce una rápida sensibilización a través de la activación de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K), la cual se acopla físicamente con el canal y facilita su inserción en la membrana. La PI3K también activa a la cinasa Src, una de las cinasas que fosforila directamente al TRPV1 (Zhang et al., 2005). Se ha descrito que la insulina y los factores de crecimiento parecidos a la insulina aumentan la expresión membranal del TRPV1 mediante la activación de la PI3K (Van Buren et al., 2005).

1.8 TRPV1 y alteraciones de la nocicepción

La participación del TRPV1 y otros canales TRP en el dolor nociceptivo e inflamatorio está ampliamente reportada, así como en el dolor neuropático y disfuncional asociado a afecciones patológicas como migraña, artritis reumatoide, osteoartritis, neuropatía diabética, dolor oncológico y síndrome de colon irritable (Beyak y Vanner, 2005; Andreev et al., 2013; Mickle et al., 2016; Wouters et al., 2016). Las primeras evidencias contundentes sobre la participación del TRPV1 en el dolor se generaron mediante la administración periférica de capsazepina en ratones, donde se observó que ese antagonista del canal atenúa la hiperalgesia térmica inducida por inflamación (Davis et al., 2000). Paralelamente se confirmó su relevancia en el dolor inflamatorio en estudios donde ratones TRPV1-KO presentaron una atenuación de la hiperalgesia térmica inducida por inflamación (Caterina et al., 2000). Actualmente se tiene evidencia de que en la inflamación generada por lesiones cutáneas se libera una amplia variedad de moléculas proinflamatorias (bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos serotonina, histamina, sustancia P, tromboxanos, factor derivado de plaquetas, adenosina, ATP, protones y radicales libres), citocinas (interleucinas, factor de necrosis tumoral) y neurotrofinas (factor de crecimiento nervioso) que en conjunto sensibilizan al canal TRPV1 aumentando su probabilidad de activación (Moore et al., 2018).

Se ha demostrado que la inhibición farmacológica del TRPV1 disminuye la alodinia mecánica en modelos animales de dolor neuropático (Kanai et al., 2005;

Yamamoto et al., 2008), atenúa la hiperalgesia térmica inducida por inflamación (Tekus et al., 2010) y reduce la hipersensibilidad dolorosa en un modelo de síndrome de intestino irritable en ratas (Winston et al., 2007). Cui y colaboradores (2006) realizaron una amplia caracterización de los efectos del A784168, un antagonista sintético selectivo del canal TRPV1, reportando que el fármaco aplicado *in vitro* inhibe las corrientes de Ca²⁺ asociadas a la apertura del TRPV1 por capsaicina o por pH ácido; mientras que su administración oral, intraplantar e intratecal en ratas bloquea el dolor agudo inducido por capsaicina y atenúa la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica en el dolor inflamatorio crónico inducido por adyuvante completo de Freund (Cui et al., 2006). También se ha reportado un efecto antinociceptivo del A784168 en la hipersensibilidad térmica y mecánica inducida por la administración intraplantar del factor de crecimiento nervioso (Mills et al., 2013) y por la administración de formalina en ratas (Martínez-Rojas et al., 2014).

Adicionalmente, se ha reportado aumento en la expresión y actividad del TRPV1 en diversos modelos de dolor. Por ejemplo, la expresión de TRPV1 aumenta en ratas con ligadura de nervios espinales y tal aumento se correlaciona con el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia térmica (Fukuoka et al., 2002). También se ha reportado en un modelo de cáncer óseo en ratas que TRPV1 se sobreexpresa en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Li et al., 2014), mientras que en biopsias de tejidos de pacientes humanos con enfermedad inflamatoria intestinal hay una mayor expresión de TRPV1 que correlaciona con la gravedad de la hipersensibilidad dolorosa (Hicks, 2006). Asimismo, se ha reportado que TRPV1 aumenta su expresión en el dolor neuropático asociado a diabetes o a la administración de terapia anticancerígena (Bourinet et al., 2014).

Por su participación predominante en la transducción de estímulos nociceptivos, el TRPV1 se considera un blanco molecular importante para el desarrollo de fármacos analgésicos (Julius, 2013; Carnevale y Rhoacs, 2016; Menkhoff y Lötsch, 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1 Regulación de TRPV1 mediada por el TLR4

Existe evidencia de que el receptor TLR4 modula la expresión de canales iónicos implicados en la nocicepción como el TRPV1 y otros miembros de la familia TRP. Diógenes y colaboradores (2011) reportaron que la activación del TLR4 con LPS aumentó la expresión del TRPV1 en neuronas nociceptoras del ganglio trigeminal. Se ha reportado también que la administración crónica de paclitaxel, un agente quimioterapéutico capaz de activar al TLR4, aumenta la síntesis y secreción de TNF α en las células satelitales, y que el TNF α aumenta la expresión de receptores TRPA1 y TRPV4 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal *in vivo* y en cultivo (Wu et al., 2015). La generación de dolor neuropático con paclitaxel induce un aumento en la cantidad de neuronas nociceptoras que coexpresan TLR4 y TRPV1, efecto que se previene con la administración de un antagonista del TLR4 (Li et al., 2015a). Además, se ha reportado que la activación del TLR4 causa sensibilización aguda del TRPV1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y en neuronas medulares a través de una vía de señalización acoplada al TLR4 (Li et al., 2015b). Estos estudios sientan un antecedente directo sobre la participación del TLR4 en la regulación de la expresión y función de TRPV1.

Se ha reportado la existencia de interacciones moleculares directas entre los receptores TLR4 y TRPV1 a través del dominio intracelular TIR del TLR4. Min y colaboradores (2018), utilizando un sistema de expresión heteróloga en células HEK293T, identificaron que la activación del TLR4 incrementa las corrientes de Ca²⁺ asociadas a la apertura del TRPV1, mientras que la carencia del TLR4 facilita el proceso de desensibilización inducida por la activación repetida del TRPV1 con capsaicina. El mismo estudio reportó que la activación repetida con capsaicina aumentó la internalización y degradación lisosomal del TRPV1 en cultivos provenientes de animales silvestres en comparación con los provenientes de animales TLR4-KO (Min et al., 2018). En otro estudio, Wu y colaboradores (2019) utilizando un modelo de dolor inflamatorio abdominal en ratones, observaron una disminución en los umbrales al dolor en pruebas conductuales, mayor infiltración

inflamatoria en el colon y una mayor expresión de TRPV1 en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de ratones silvestres comparados con ratones TLR4-KO. Adicionalmente, mediante electrofisiología, identificaron que las corrientes asociadas a la apertura del TRPV1 evocadas por capsaicina aumentaron tras la administración de LPS en los animales silvestres, pero no en los TLR4-KO. Este estudio muestra que el TLR4 podría desempeñar una función importante en la regulación de la expresión y función del canal TRPV1 en la hiperalgesia desarrollada en condiciones de inflamación periférica.

En un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento en ratas, se ha reportado que la administración intratecal de glicirricina y de antagonistas del receptor TLR4 revierte parcialmente la alodinia mecánica inducida por estrés crónico (Velázquez-Lagunas, 2017). En el mismo trabajo se identificó que el estrés crónico aumenta la expresión de HMGB1 y TLR4 en los ganglios de la raíz dorsal y en la porción dorsal de la médula espinal, así como un aumento de la inmunorreactividad a marcadores de microglía y astrocitos. Ello sugiere que tanto la alarmina HMGB1 como el receptor TLR4, y posiblemente la activación de células microgliales y astrocitos, participan en el desarrollo de hipersensibilidad al dolor inducida por estrés crónico.

Por otra parte, Muñoz-Castillo (2018) reportó que la privación de sueño MOR en ratas induce un estado de alodinia mecánica generalizada que se revierte con la administración intratecal de A784168, un antagonista selectivo del receptor TRPV1. En el mismo trabajo se identificó que la expresión de TRPV1 aumentó en los ganglios de la raíz dorsal y en la región dorsal de la médula espinal tras 48 h de privación de sueño MOR. Este estudio representa una evidencia directa de que el receptor TRPV1 tiene participación en la hipersensibilidad al dolor inducida por privación de sueño MOR.

En conjunto, los estudios señalados dan pie a la hipótesis de que la activación del receptor TLR4 podría estar implicada en los cambios de la expresión del canal TRPV1 y en el desarrollo de alodinia mecánica inducida por privación de sueño MOR en ratas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la nocicepción relacionadas con trastornos del sueño presentan una alta incidencia y representan un problema de salud que afecta la funcionalidad física y salud psicológica. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a su desarrollo se conocen parcialmente (Edwards et al., 2008; Kumar y Chanana, 2014; Larson y Carter, 2016; Latremoliere et al., 2017; Chattu et al., 2018; Krause et al., 2019). Debido a que el dolor maladaptativo y los problemas de sueño afectan la calidad de vida, investigar los mecanismos que asocian a ambos trastornos es clave para el desarrollo de mejores tratamientos y estrategias de prevención para tales condiciones (Andersen, 2018).

Reportes previos han mostrado que la expresión del canal TRPV1 aumenta tras la privación de sueño MOR en ratas (Muñoz-Castillo, 2018) y que el bloqueo del receptor TLR4, así como la inhibición de la proteína HMGB1 tienen efecto antinociceptivo en un modelo de dolor crónico inducido por restricción de movimiento (Velázquez-Lagunas, 2017). Adicionalmente, algunos estudios han mostrado evidencia de que el receptor TLR4 modula la expresión del canal TRPV1 (Li et al., 2015a; Li et al., 2015b; Min et al., 2018; Wu et al., 2019). Sin embargo, aún se desconoce si el receptor TLR4 participa en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por privación de sueño MOR en ratas y si modula la expresión y función del TRPV1 en esta condición.

4. HIPÓTESIS

La activación de la vía HMGB1-TLR4 participará en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR en ratas, a través de la modulación del canal TRPV1.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la participación de la vía HMGB1-TLR4 y su efecto sobre la función y la expresión del canal TRPV1 en la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR en ratas.

5.2 Objetivos particulares

1. Replicar el modelo de privación de sueño MOR en ratas por el método de tanque con agua y plataformas múltiples.
2. Determinar farmacológicamente la participación de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR en ratas.
3. Evaluar mediante *Western blot*, posibles cambios en la expresión de HMGB1, TLR4 y TRPV1 inducidos por privación de sueño MOR en ratas.
4. Determinar mediante farmacología y *Western blot*, si la inhibición del receptor TLR4 modifica la función y expresión del canal TRPV1 en el modelo de privación de sueño MOR en ratas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar con un peso entre 180 a 220 g. Para los experimentos farmacológicos se utilizaron también grupos de machos como controles para identificar o descartar posibles diferencias asociadas al sexo. Los animales se obtuvieron del bioterio del Cinvestav Sede Sur y se mantuvieron en grupos de 4 individuos, en condiciones ambientales controladas: ciclo luz-oscuridad de 12:12 h, temperatura ambiental de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, así como agua y alimento *ad libitum*. El manejo de los animales y los protocolos de experimentación se efectuaron acatando lo establecido en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 y las directrices de estándares éticos para la investigación del dolor en animales (Zimmerman, 1983). Los animales se sometieron a eutanasia al finalizar los experimentos mediante una cámara de CO_2 .

6.2 Fármacos

El 3,6-dihidro-3'-(trifluorometil)-*N*-[4-[(trifluorometil) sulfonil] fenil]-[1(2*H*), 2'-bipiridina]-4-carboxamida, antagonista del canal TRPV1 (A784168; Tocris Bioscience; Bristol, UK) y la glicirricina, inhibidor de la proteína HMGB1 (CDS020796; Sigma-Aldrich; St Louis, MO) se disolvieron en DMSO al 30% y al 1.5% respectivamente, para tener una concentración de 1 mM. El lipopolisacárido de *Rhodobacter sphaeroides*, antagonista del receptor TLR4 (LPS-RS; InvivoGen; San Diego, CA) se disolvió en agua inyectable a una concentración de 5 mg/ml. Las soluciones stock de los fármacos se mantuvieron congeladas a -20°C para su almacenamiento y se prepararon las concentraciones requeridas antes de cada uso.

6.3 Modelo de privación de sueño MOR

Para la privación selectiva de sueño MOR se utilizó el modelo de tanque con agua y plataformas múltiples (Van Hulzen y Coenen, 1981). Se empleó una caja de

acrílico con dimensiones de 82 x 59 x 48 cm que contiene 6 plataformas elevadas distribuidas uniformemente, con altura de 12 cm y diámetro de 6.5 cm, así como una tapa de rejilla metálica que permite libre acceso a alimento y agua (**Figura 6**). Los animales se sometieron a un periodo de habituación en el que se colocaron en el tanque sin agua y con cama de aserrín por lapso de 1 a 2 h durante dos días consecutivos antes de la privación de sueño con el fin de que identificaran la ubicación del alimento y agua bebible en la caja experimental.

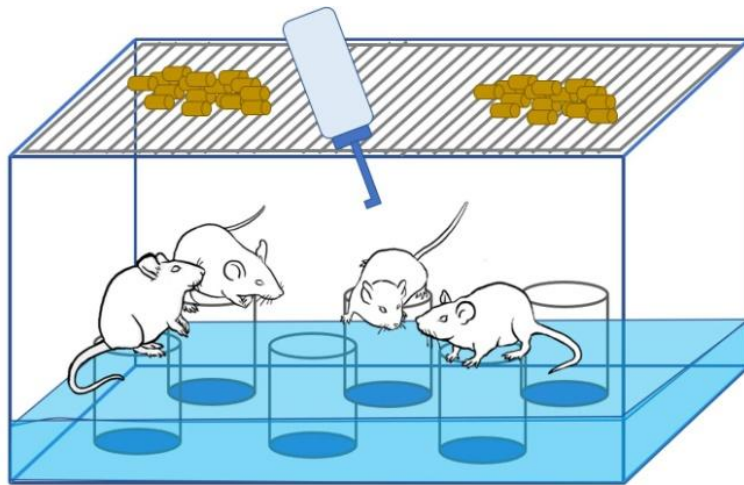


Figura 6. Representación de la caja experimental utilizada para replicar el modelo de privación de sueño MOR mediante tanque con agua y plataformas múltiples. Los animales se alojaron en grupos de 4 en la caja experimental, permitiendo que pudieran cambiar de plataforma para evitar el estrés por inmovilidad.

Durante el periodo de privación de sueño, el tanque contenía agua hasta aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie de las plataformas. El inicio del periodo de privación de sueño se estableció al comienzo de la fase luminosa del ciclo luz-oscuridad (7 am). Se ingresaron los animales en grupos de 4 para permitir que tuvieran oportunidad de cambiar de plataforma y reducir de este modo el estrés adicional que generaría su inmovilidad (Van Hulzen y Coenen, 1981). En estas condiciones, es posible que los animales entren en las fases de sueño no MOR. Sin embargo, la pérdida del tono muscular característica del sueño MOR provoca que apenas entren en esta fase del sueño, caigan al agua y despierten. Machado y colaboradores (2004) validaron mediante monitoreo

electroencefalográfico y electromiográfico en ratas que el modelo en cuestión suprime la fase de sueño MOR. Las ratas control permanecieron en la misma habitación, en grupos de 4, alojadas en cajas de acrílico convencionales con cama de aserrín y se sometieron a manejo diario y habituación en la caja experimental en las condiciones descritas.

6.4 Evaluación de la nocicepción mecánica

Para determinar si la privación de sueño MOR indujo cambios en el umbral nociceptivo, se evaluaron conductas de retiro ante estímulos mecánicos de diferente intensidad aplicados con filamentos calibrados de von Frey (Touch Test® Sensory Evaluators; North Coast Medical Inc.; Morgan Hill, CA) utilizando el método Up & Down para determinar el 50% del umbral de retiro (Dixon 1980; Chaplan et al., 1994).

Para la evaluación del umbral de retiro, las ratas se colocaron en cajas elevadas de acrílico con piso de malla metálica para tener acceso a las patas. Se permitió un tiempo de habituación de aproximadamente 15 minutos o el tiempo necesario para que cesaran las conductas exploratorias y de acicalamiento. Se utilizaron los filamentos comprendidos en el rango de 0.4 g a 15 g. Se dio inicio a la prueba aplicando un estímulo con el filamento de 2 g sobre la parte media de la superficie plantar del miembro posterior izquierdo o derecho, evitando los puntos menos sensibles (almohadillas plantares), con fuerza suficiente para generar un ligero pandeo del filamento durante 6 a 8 s. El retiro brusco de la pata durante la aplicación del estímulo o inmediatamente después del retiro del filamento se consideró una respuesta positiva ("x") y en tal caso se prosiguió con la aplicación del filamento anterior más delgado. La deambulación se consideró una respuesta ambigua y en tal caso se repitió la aplicación del mismo filamento. La ausencia del retiro de la pata se consideró una respuesta negativa ("o") y se prosiguió en tal caso con la aplicación del siguiente filamento más grueso. Los estímulos se aplicaron a intervalos de varios segundos, lo que permitió evitar respuestas conductuales asociadas a la aplicación de estímulos previos. A partir del primer

cambio en el patrón de respuestas (de “o” a “x” o viceversa) se realizaron 4 evaluaciones adicionales para completar una serie de 6 valores a partir de los cuales se estimó el 50% del umbral de retiro utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{50\% Umbral (g)} = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10,000$$

Donde:

Xf: Valor del último filamento de von Frey utilizado (en unidades logarítmicas)

K: factor de corrección indicado en la tabla publicada por Dixon (1980) para el patrón de respuestas positivas y/o negativas obtenidas en la prueba

δ: Diferencia de media entre el patrón de respuestas obtenido (unidades logarítmicas)

El 50% del umbral de retiro se interpreta como la intensidad de estímulo requerido para provocar una respuesta positiva en el 50% de las aplicaciones de estímulos.

6.5 Administración intratecal de fármacos

Los fármacos se administraron vía intratecal mediante la técnica de inyección transcutánea directa (**Figura 7**) en un volumen final de 10 µl. Para tal fin, los animales se anestesiaron brevemente con isoflurano (Fluriso™, Vet One, Idaho) y se aplicó la inyección utilizando jeringas de 0.5 ml con aguja 31 G x 8 mm, a nivel del espacio entre los procesos espinosos de las vértebras L5 y L6, inyectando de forma perpendicular a la columna vertebral. La manifestación del reflejo motor en la cola se tomó como signo de punción exitosa en el espacio subaracnoideo y se procedió a la administración del fármaco.

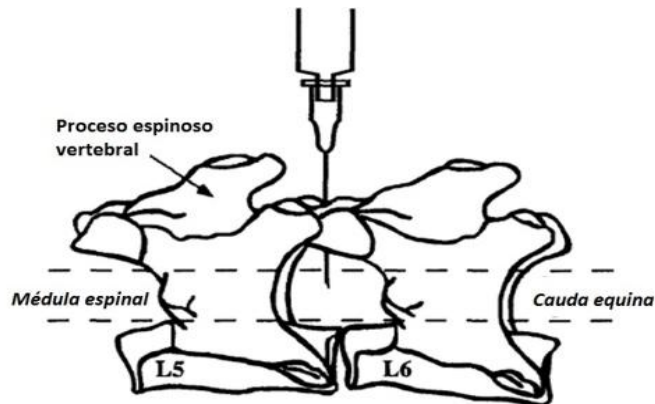


Figura 7. Técnica de inyección transcutánea directa para administración intratecal. Diagrama que muestra el sitio de inserción de la aguja (espacio intervertebral entre L5 y L6) para efectuar la administración intratecal de fármacos (modificado de Mestre et al., 1994).

6.6 Prueba de coordinación motriz

Para descartar o identificar posibles efectos de los fármacos utilizados sobre la actividad de estructuras implicadas en el control motor, se realizó una prueba de coordinación motriz. Esta consistió en colocar a los animales en un cilindro giratorio (Rota-rod / RS, Panlab, Barcelona) a una velocidad de 11 revoluciones por minuto. Las ratas se entrenaron durante 3 días previos a la prueba, en los cuales se colocaron en el Rota-rod durante un periodo de 10 minutos. La prueba consistió en someter a los animales al cilindro giratorio durante 5 minutos en condiciones basales y 3 h después de la administración de la concentración máxima probada de los fármacos A784168, glicirricina y LPS-RS. Se cuantificó el número de caídas en ese periodo de tiempo.

6.7 Inmunodetección de proteínas por *Western blot*

6.7.1 Extracción y procesamiento de tejidos

Para obtener muestras de tejido nervioso, los animales se decapitaron e inmediatamente después se procedió a extraer la médula espinal mediante presión hidráulica con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). Se obtuvo la sección lumbar de la médula (L4 a L6) y se separó en porciones dorsal y ventral. Se obtuvieron también los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal L4 y L5 de ambos lados. Las muestras de tejido de cada rata se almacenaron por separado en tubos de centrifugación a -70°C hasta su procesamiento.

Los tejidos se homogeneizaron a 4°C utilizando solución amortiguadora de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) adicionado con Tritón X-100 al 1%, inhibidores de fosfatasa en proporción 1:100 de soluciones stock (β -glicerol 5 mM, NaF 50 mM, PMSF 100 mM, ortovanadato 280 mM) e inhibidores de proteasas en proporción 1:1000 de soluciones stock (aprotinina 2 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, pepstatina 10 mg/ml) hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13500 rpm, a 4°C

durante 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.7.2 Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales en las muestras de tejido se estimó por el método de Bradford, utilizando la proteína γ -globulina para la construcción de la curva patrón. Un microlitro de cada muestra se disolvió en proporción 1:20 con solución amortiguadora RIPA y se adicionaron a cada muestra 250 μl de reactivo de Bradford (BIO-RAD laboratories Inc.; Hercules, CA) diluido previamente en agua destilada en proporción 1:5. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos de cada muestra se extrapolaron con un ajuste lineal de la curva patrón para estimar la concentración de proteínas.

6.7.3 Western blot

Cincuenta microgramos de proteínas totales de cada muestra se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Posteriormente, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de polivinilideno (PVDF), las cuales se bloquearon previamente con leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos (PBS; NaCl 137 nM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 nM y KH_2PO_4 2 nM) y 0.1% de Tween 20 (PBS-T) durante 1 h. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 12 h a 4°C con el anticuerpo primario para TLR4 (1:500; Cat. sc-293072, Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX), HMGB1 (1:500; Cat. sc-135809, Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX), o TRPV1 (1:500; Cat. sc-398417; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX) en PBS-T. Después de la incubación, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con leche descremada al 1% en PBS-T. El anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (1:5000; Cat. 115-035-003; Jackson Immuno Research Laboratories; West Grove, PA) se incubó durante 1 h, posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con leche descremada al 1% en PBS-T.

La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore; Burlington, MA), las imágenes se obtuvieron con el equipo C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences; Lincoln, NE) y se analizaron en el software Image Studio 5.2 (LI-COR Biosciences; Lincoln, NE) para cuantificar la densidad óptica de la señal. La proteína β -actina se utilizó como control de carga, para lo cual se empleó el anticuerpo primario para actina (1:5000; Cat. MAB1501R; Millipore; Burlington, MA o 1:15000; Cat. GTX629630; GeneTex; Irvine, CA) y el anticuerpo secundario anti-ratón antes señalado (1:5000).

6.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de la evaluación de conductas nociceptivas (50% del umbral de retiro) se reportan como la media \pm el error estándar para cada grupo experimental ($n = 6$) y a partir de ellos se construyeron cursos temporales. Posteriormente se estimó el área bajo la curva de los cursos temporales por el método de los trapecoides y los datos se reportan como la media \pm error estándar de las unidades de área. Para los ensayos de expresión de proteínas, los datos se normalizaron como el índice de intensidad relativa obtenida contra el control de carga (β -actina) y los datos se reportan como la media \pm el error estándar para cada grupo experimental ($n = 4$).

Para evaluar diferencias entre 3 o más grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post-hoc Student-Newman-Keuls o Dunnet. Para el caso de comparaciones entre dos grupos se utilizó T de Student. Los datos se analizaron con el programa Graph Prism 6.0 (GraphPad Software; San Diego, CA). Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$.

6.9 Diseño experimental

6.9.1 Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro inducidos por privación de sueño MOR

Para caracterizar los cambios en la nocicepción inducidos por la privación de sueño MOR, se evaluó el umbral de retiro ante la estimulación mecánica a un grupo de 6 ratas hembra y a un grupo de 6 ratas macho en ambas patas traseras, antes de introducir a los animales a la caja experimental (basal), a las 24 y 48 h de privación de sueño MOR, así como a las 24 y 48 h de recuperación posteriores al periodo de privación de sueño (**Figura 8**).

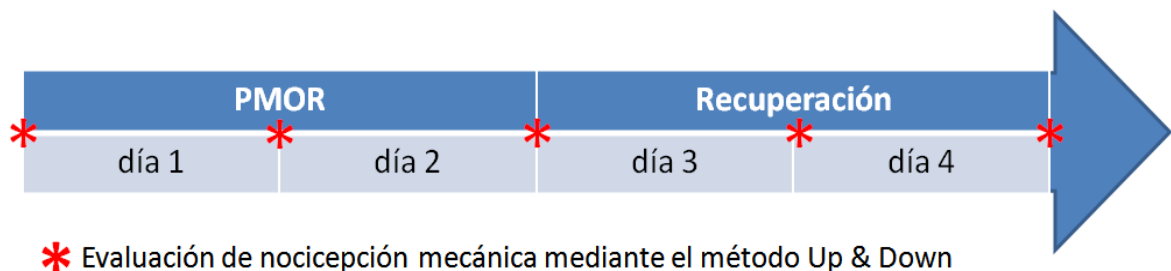


Figura 8. Diseño experimental 1. Caracterización de los cambios en el umbral de retiro inducidos por privación de sueño MOR.

6.9.2 Determinación de la participación de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

Para evaluar la participación de las proteínas de interés en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño, se administró glicirricina (inhibidor de HMGB1), LPS-RS (antagonista del TLR4) o A784168 (antagonista del TRPV1) a ratas hembra con 48 h de privación de sueño MOR a las concentraciones señaladas en la **Tabla 5** en un volumen final de 10 μ l. Tras la administración de los fármacos, se evaluó el efecto sobre el umbral de retiro durante 24 h, midiendo a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 h de su administración. Las concentraciones máximas de cada fármaco se probaron también en machos para identificar posibles diferencias asociadas al sexo.

Tabla 5. Concentraciones de fármacos utilizadas

| Fármaco | Concentraciones ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) |
|--------------|--|
| glicirricina | 0.0025, 0.025, 0.25 y 2.5 |
| LPS-RS | 0.1, 0.3, 1 y 10 |
| A784168 | 1, 10, 100 ng y 1 |

6.9.3 Identificación de la participación de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el desarrollo de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

Con el fin de evaluar la participación de la proteína HMGB1, el receptor TLR4 y el canal TRPV1 en el desarrollo de la alodinia táctil inducida por privación de sueño, se aplicó un pretratamiento con 4 administraciones de la concentración máxima probada de cada fármaco (una administración cada 8 h). Posteriormente se sometió a los animales a privación de sueño MOR durante 48 h y al finalizar el mismo se realizó un curso temporal de 24 h evaluando el umbral de retiro (**Figura 9**).

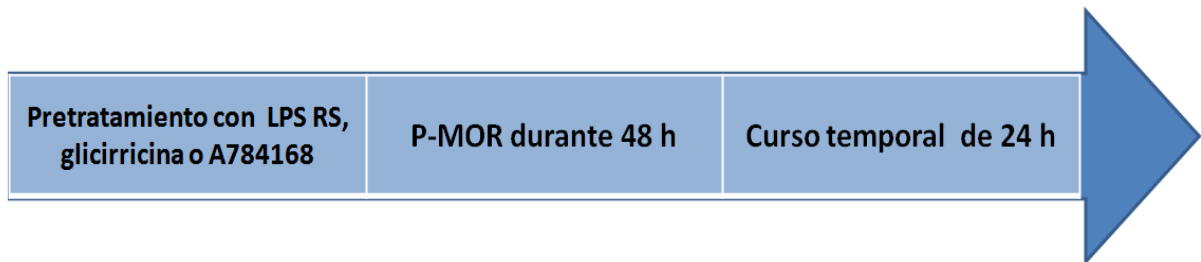


Figura 9. Diseño experimental 3. Esquema de pretratamiento para evaluar la participación del receptor TLR4, HMGB1 y canal TRPV1 en el desarrollo de la alodinia táctil inducida por P-MOR.

6.9.4 Determinación del curso temporal de la expresión de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en el modelo de privación de sueño MOR mediante *Western blot*

Para determinar los posibles cambios en la expresión de HMGB1, TLR4 y TRPV1 inducidos por la privación de sueño MOR, se realizó la inmunodetección de dichas proteínas mediante *Western blot* a partir de muestras de ganglios de la raíz dorsal

(GRD L4-L5) y médula espinal dorsal a grupos de 4 ratas hembra, bajo el esquema descrito en la **Figura 10**.

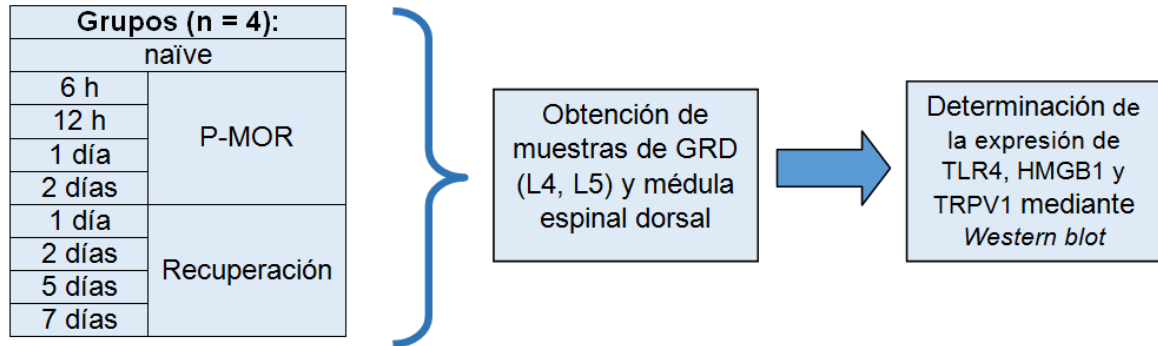


Figura 10. Diseño experimental 5. Toma de muestras de tejidos para determinar los cambios en la expresión de HMGB1, TLR4 y TRPV1 inducidos por privación de sueño MOR (P-MOR) mediante *Western blot*.

6.9.5 Identificación de cambios en la actividad y expresión de TRPV1 mediados por TLR4

Con el fin de evaluar si la activación del receptor TLR4 tiene efecto sobre la actividad pronociceptiva del canal TRPV1, se aplicó un pretratamiento con una administración única de 1 o 10 μg de LPS-RS antes de un periodo de privación de sueño MOR de 48 h. Posteriormente, se evaluó el efecto de la administración intratecal de 10 o 100 ng de A784168 mediante un curso temporal de 24 h evaluando el umbral de retiro.

Para determinar si la actividad del receptor TLR4 tiene efecto sobre la expresión del canal TRPV1 se aplicó un pretratamiento con 4 administraciones de LPS-RS (10 μg cada 8 h) a un grupo de ratas hembra. Posteriormente los animales se sometieron a un periodo de 48 h de privación de sueño MOR y al finalizar el mismo se obtuvieron los ganglios de la raíz dorsal (L4 y L5) y la médula espinal dorsal para determinar la expresión del canal TRPV1 mediante *Western blot*.

7. RESULTADOS

7.1 La privación de sueño MOR indujo el desarrollo de alodinia táctil en ratas

La privación de sueño MOR redujo el 50% del umbral de retiro a partir de las 24 h y hasta niveles considerados alodinia mecánica en ratas (< 4 g) a las 48 h (**Figura 11A**). Los cambios en el umbral de retiro y la alodinia táctil fueron similares en ambas extremidades posteriores (**Figura 11B**). La privación de sueño MOR indujo alodinia táctil tanto en las ratas hembras como en los machos (**Figura 11C y D**). El umbral de retiro regresó a valores similares al control con dos días de descanso libre tras el periodo de privación de sueño (**Figura 11A y C**). Estos datos sugieren que la privación de sueño MOR durante 48 h produce alodinia mecánica generalizada, tanto en ratas hembras como machos.

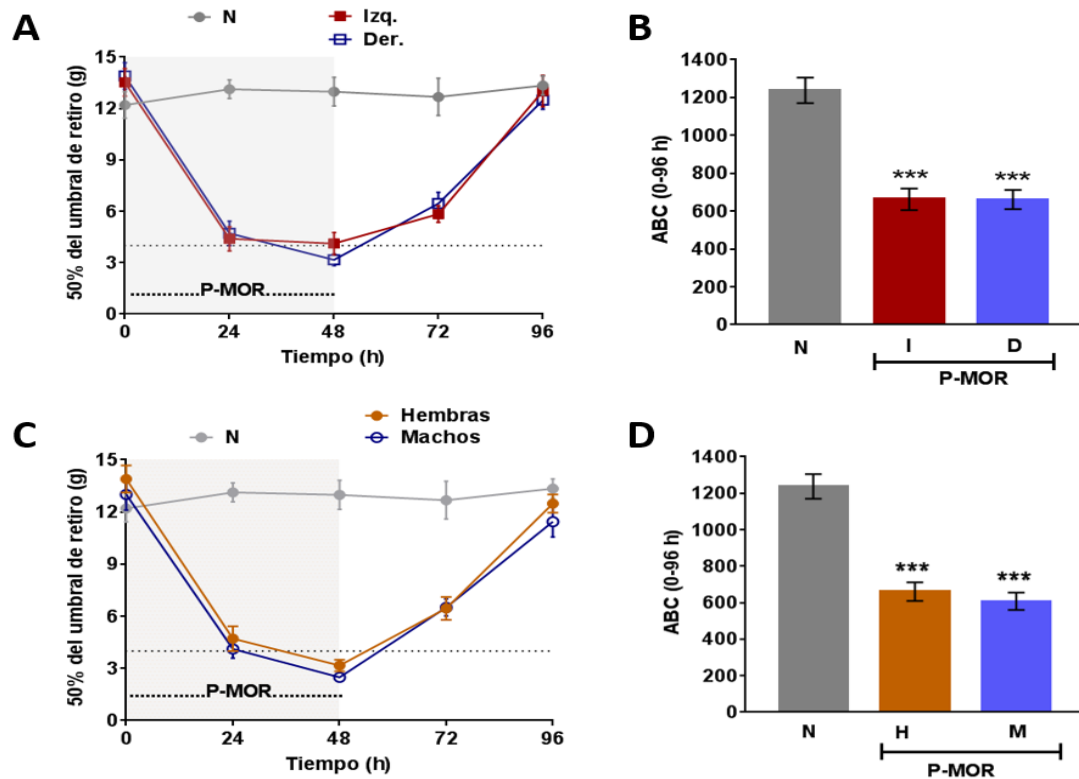


Figura 11. Efecto de la privación de sueño MOR sobre el 50% del umbral de retiro en ratas.

A. Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro durante y dos días posteriores a la privación de sueño MOR (P-MOR) por 48 h. La evaluación se realizó en las patas traseras izquierda (I) y derecha (D) de ratas hembras y se comparó con un grupo naïve (N). **B.** Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal A. **C.** Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro evaluado en la pata trasera derecha, durante y dos días posteriores a la privación de sueño MOR de 48 h en ratas hembras (H) y machos (M). **D.** ABC calculada a partir del curso temporal C. Los datos representan el promedio \pm error estándar, $n=6$. *** $p < 0.001$ contra el grupo N, por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.2 El inhibidor de HMGB1 (glicirricina) revirtió la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

La administración intratecal de glicirricina, un inhibidor de la proteína HMGB1, pero no de su vehículo (DMSO 1.5%), revirtió la alodinia táctil inducida por 48 h de P-MOR, alcanzando un efecto máximo a las 3 h después de la administración (Figura 12A). El efecto de la glicirricina fue concentración dependiente (Figura 12B). La administración de 2.5 μ g de glicirricina tuvo un efecto similar tanto en ratas hembras como machos (Figura 12C y D).

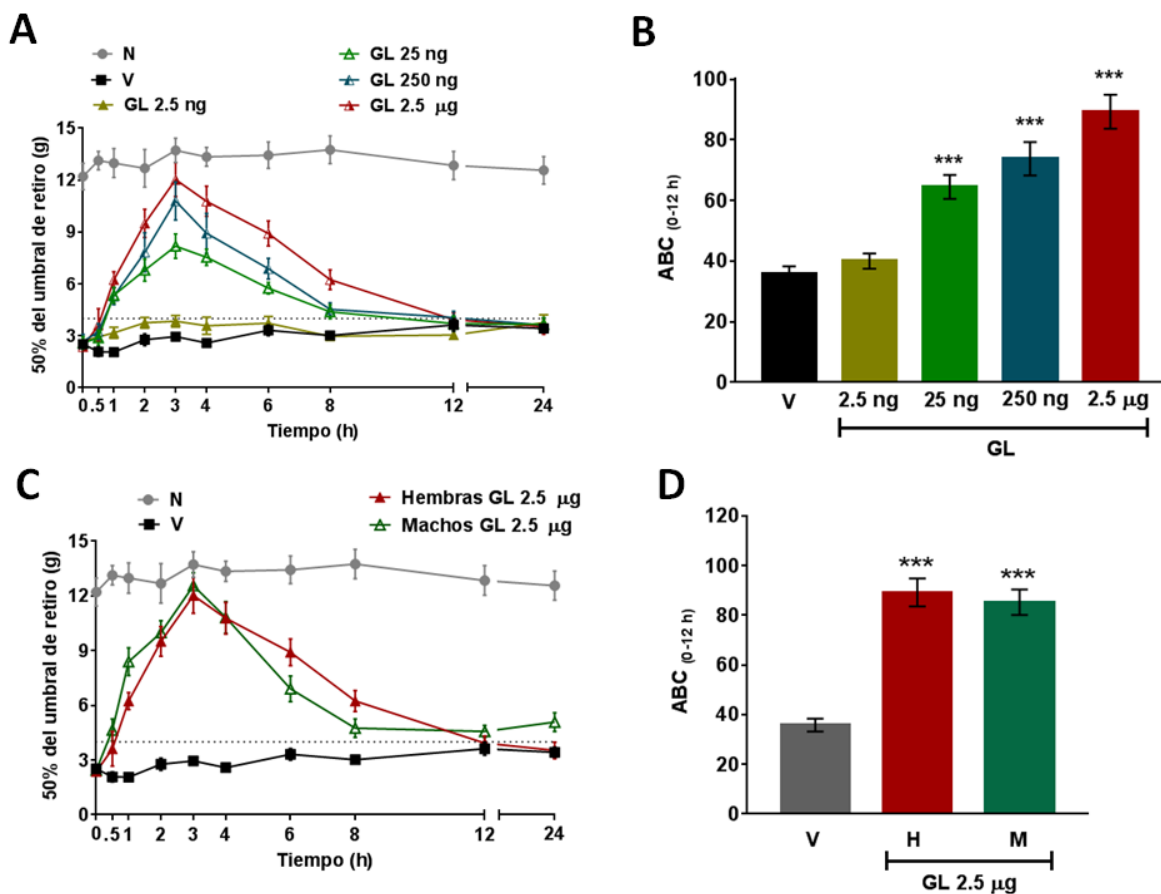


Figura 12. Efecto de la glicirricina sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de glicirricina (GL, 2.5 ng - 2.5 μ g) o su vehículo (V) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembra. **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. **C.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de 2.5 μ g de glicirricina sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembras (H) y machos (M). **D.** ABC calculada a partir del curso temporal C. Los datos representan el promedio \pm error estándar, n=6. *** $p < 0.001$ contra el grupo V, por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.3 El antagonista del TLR4 (LPS-RS) revirtió la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

La administración intratecal de LPS-RS, un antagonista selectivo del receptor TLR4, pero no de su vehículo (H₂O inyectable), revirtió la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR alcanzando un efecto máximo a las 3 h después de la administración (Figura 13A). El efecto del LPS-RS fue concentración dependiente (Figura 13B). La administración de 10 µg de LPS-RS tuvo efecto similar en ratas hembras y machos (Figura 13C y D).

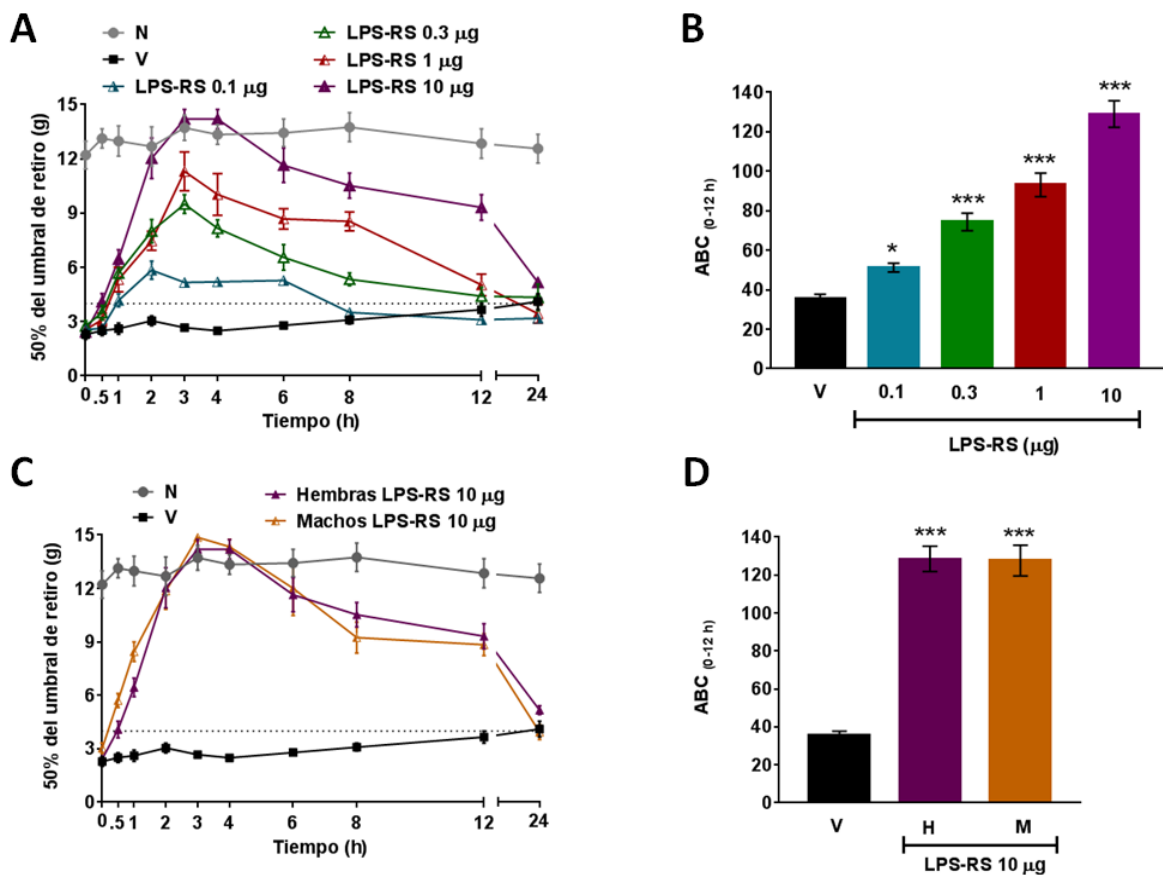


Figura 13. Efecto del LPS-RS sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de LPS-RS (0.1 - 10 µg) o su vehículo (V) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembra. **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. **C.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de 10 µg de LPS-RS sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembras (H) y machos (M). **D.** ABC calculada a partir del curso temporal C. Los datos representan el promedio ± error estándar, n=6. * p < 0.05, *** p < 0.001 contra el grupo V, por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.4 El antagonista del receptor TRPV1 (A784168) revirtió la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

La administración intratecal de A782168, un antagonista selectivo del canal TRPV1, pero no de su vehículo (DMSO 30%), revirtió la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR, alcanzando un efecto máximo a las 3 h después de la administración (**Figura 14A**). El efecto del A784168 fue concentración dependiente (**Figura 14B**). La administración de 1 μg de A784168 tuvo un efecto similar tanto en ratas hembras como machos (**Figura 14C y D**).

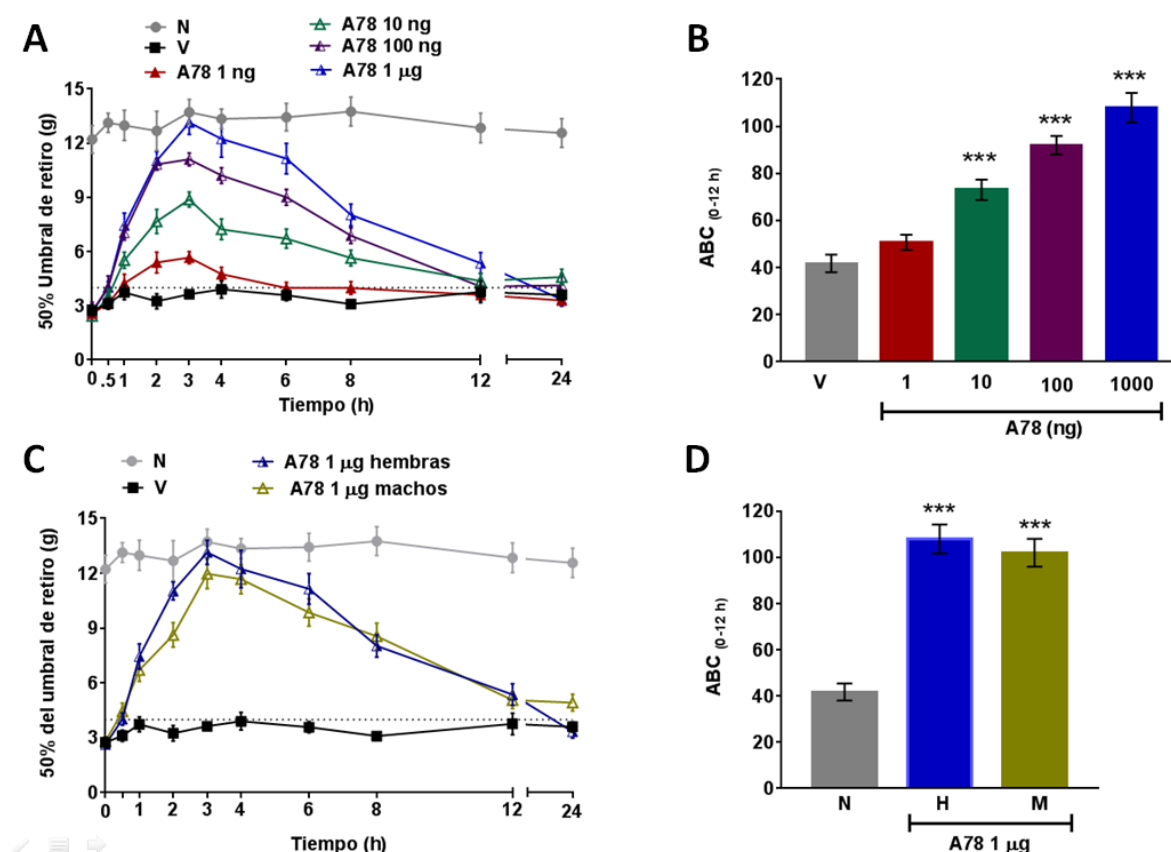


Figura 14. Efecto del A784168 sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de A784168 (A78, 1 - 1000 ng) o su vehículo (V) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembra. **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. **C.** Curso temporal del efecto de la administración intratecal de 100 ng de A78 sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembras (H) y machos (M). **D.** ABC calculada a partir del curso temporal C. Los datos representan el promedio \pm error estándar, $n=6$. *** $p < 0.001$ contra el grupo V, por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.5 Efecto de los vehículos y concentraciones máximas de los fármacos sobre el umbral de retiro en ratas naïve

La administración intratecal de los vehículos (H₂O inyectable y DMSO al 30%), así como las concentraciones máximas de los fármacos LPS-RS (10 µg/10 µl) y A784168 (1µg/10 µl) no tuvo efecto sobre el 50% del umbral de retiro en ratas naïve. Sin embargo, la administración de glicirricina a la concentración máxima probada (2.5 µg/10 µl) redujo transitoriamente el 50% del umbral de retiro durante las primeras 2 h posteriores a su administración (**Figura 15A y B**).

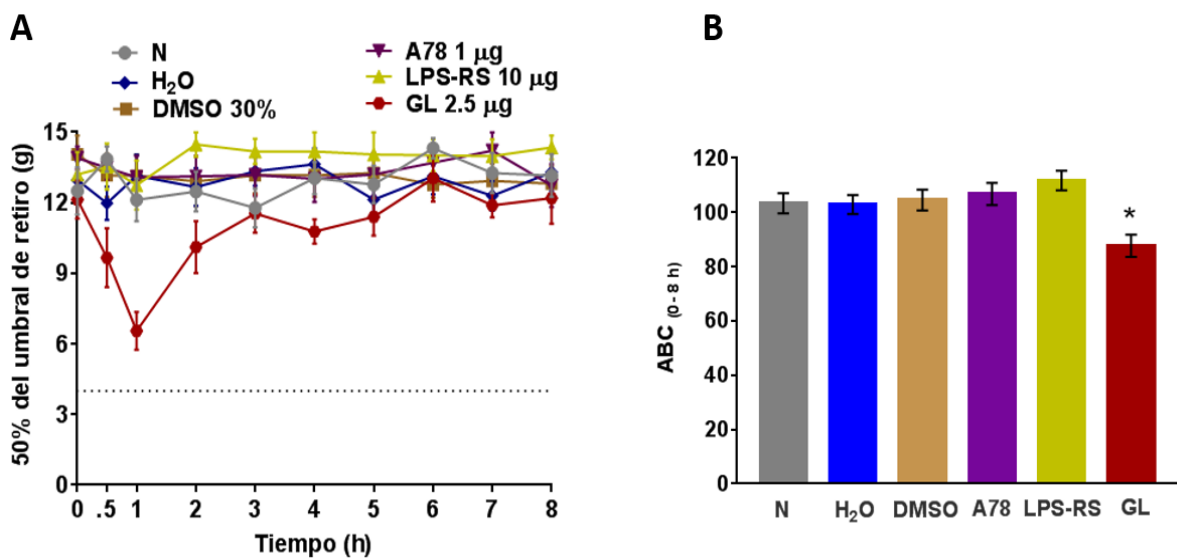


Figura 15. Efecto de los vehículos y concentraciones máximas de los fármacos en ratas naïve. **A.** Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro evaluado en la pata trasera derecha tras la administración intratecal de H₂O inyectable, DMSO al 30%, LPS-RS (10 µg), glicirricina (GL, 2.5 µg) y A784168 (A78 1 µg) respecto a animales naïve (N) **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. Los datos representan el promedio ± error estándar, n=6. * p < 0.05 contra el grupo N, por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.6 Los fármacos probados no afectaron la coordinación motriz

La administración intratecal de los vehículos (H₂O y DMSO al 30%) y de las concentraciones máximas probadas de glicirricina (2.5 µg/10 µl), LPS-RS (10 µg/10 µl) y A784168 (1 µg/10 µl) en ratas naïve no generó cambios en la coordinación motora de los animales en la prueba de Rota-rod respecto a la observada en condiciones control. Los resultados de esta prueba descartan que los efectos de los fármacos probados sobre el 50% del umbral de retiro se deban a efectos inespecíficos sobre el control motor de los animales (**Tabla 6**).

Tabla 6. Resultados de la prueba de coordinación motriz. Se indica la mediana y el rango del número de caídas por grupo (n = 6) en condiciones basales y 3 h después de la administración de vehículos (H₂O o DMSO al 30%) o concentraciones máximas de los fármacos probados (glicirricina, LPS-RS o A784168).

| Vehículo o fármaco (10 µl) | Basal | | 3 h después de la administración | |
|-------------------------------|---------|-------|-------------------------------------|-------|
| | mediana | rango | mediana | rango |
| H ₂ O inyectable | 0 | 0-1 | 0 | 0-1 |
| DMSO 30% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glicirricina (2.5 µg) | 0 | 0-2 | 0 | 0 |
| LPS-RS (10 µg) | 0 | 0 | 0 | 0-2 |
| A784168 (1 µg) | 0 | 0 | 0 | 0-1 |

7.7 El pretratamiento con LPS-RS impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por P-MOR

El pretratamiento con una sola administración de LPS-RS (10 μ g), justo antes del inicio de la privación de sueño, no tuvo efecto sobre los cambios en el umbral de retiro ni impidió el desarrollo de alodinia táctil tras 48 h de privación de sueño MOR (**Figura 16A**). En contraste, el pretratamiento con 3 (una cada 12 h) o con 4 administraciones (una cada 8 h) de LPS-RS (10 μ g), durante las 24 h previas al inicio de la privación de sueño, atenuaron de manera significativa el desarrollo de hipersensibilidad mecánica e impidieron el desarrollo de alodinia táctil en ratas expuestas a 48 h de privación de sueño MOR (**Figura 16A y B**). Además, se observó una recuperación rápida del umbral de retiro a valores basales en los animales que recibieron pretratamiento con LPS-RS (**Figura 16A**). Estos datos sugieren que la activación del receptor TLR4 participa en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la privación de sueño MOR.

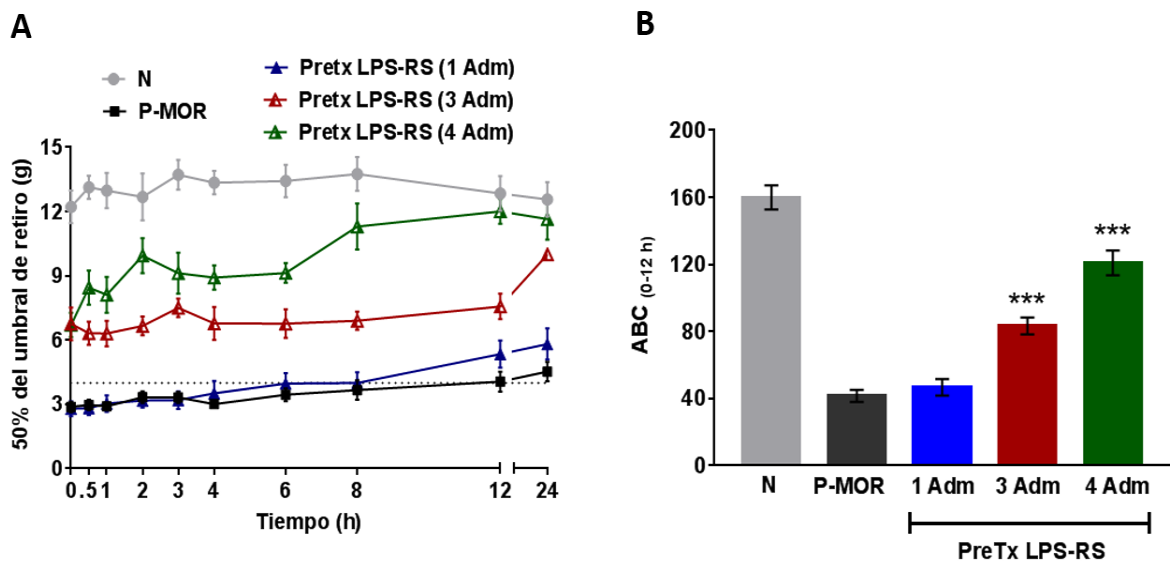


Figura 16. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal del efecto del pretratamiento con 1, 3 o 4 administraciones (Adm) de 10 μ g de LPS-RS vía intratecal (PreTx LPS-RS) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembra. **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. Los datos representan el promedio \pm error estándar, n=6. *** p < 0.001 contra el grupo sometido a privación de sueño MOR sin pretratamiento (P-MOR), por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.8 El pretratamiento con glicirricina impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

Dado que el pretratamiento con 4 administraciones de LPS-RS generó el mejor efecto, se utilizó ese mismo esquema de administración para la glicirricina y el A784168. El pretratamiento con 4 administraciones (una cada 8 h) de 2.5 μg de glicirricina, durante las 24 h previas al inicio de la privación de sueño, atenuó el desarrollo de hipersensibilidad mecánica inducida por 48 h de privación de sueño MOR, impidiendo que el umbral de retiro alcanzara valores considerados alodinia mecánica. Adicionalmente, se observó una recuperación rápida del umbral de retiro en los animales pretratados, alcanzando valores similares a los de ratas naïve tras 24 h de descanso (**Figura 17A**). La reducción en el umbral de retiro observado en ratas con pretratamiento fue estadísticamente diferente respecto a los animales que no lo recibieron (**Figura 17B**). Estos datos sugieren que la proteína HMGB1 participa, al menos parcialmente, en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la privación de sueño MOR.

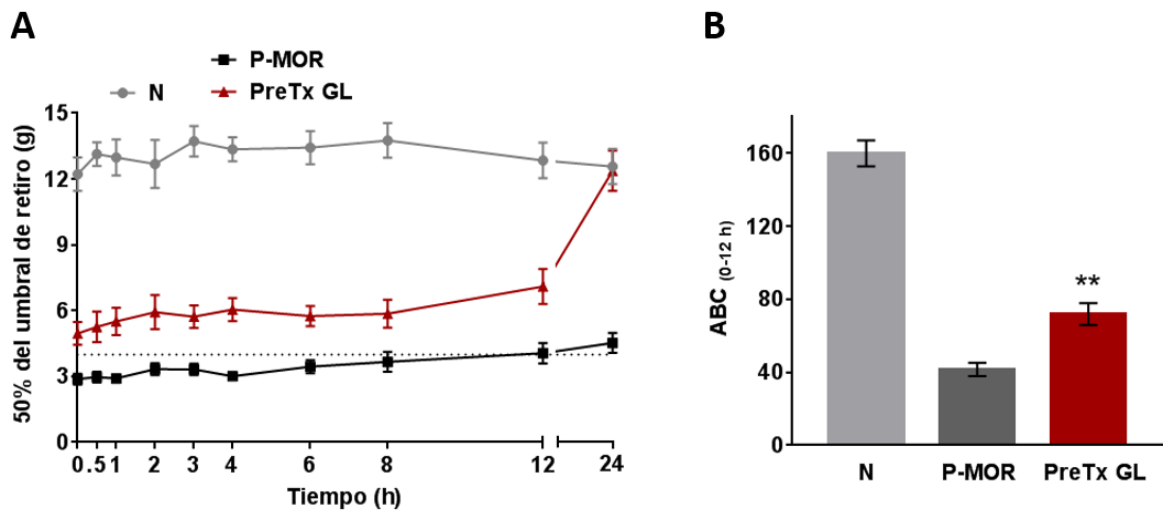


Figura 17. Efecto del pretratamiento con glicirricina sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal del efecto del pretratamiento con 4 administraciones de 2.5 μg de glicirricina vía intratecal (PreTx GL) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembra. **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. Los datos representan el promedio \pm error estándar $n=6$. ** $p < 0.01$ contra el grupo sometido a privación de sueño MOR sin tratamiento (P-MOR), por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

7.9 El pretratamiento con A784168 no impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por P-MOR

El pretratamiento con 4 administraciones de A784168 (1 μ g cada 8 h) de A784168 durante las 24 h previas a la privación de sueño, no impidió el desarrollo de alodinia mecánica en ratas expuestas a 48 h de privación de sueño MOR (**Figura 18A**). Las ratas que recibieron pretratamiento con A784168 presentaron cambios similares en el umbral de retiro a los observados en ratas que no lo recibieron (**Figura 18B**). Este resultado sugiere que el canal TRPV1 no participa en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la privación de sueño MOR.

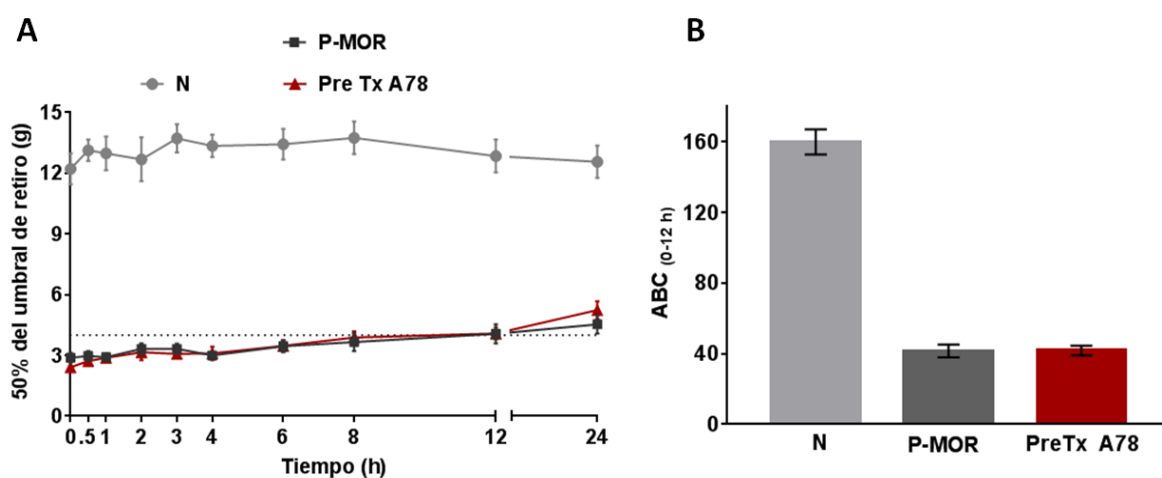


Figura 18. Efecto del pretratamiento con A784168 sobre la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal del efecto del pretratamiento con 4 administraciones de 1 μ g de A784168 vía intratecal (PreTx A78) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR en ratas hembra. **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. Los datos representan el promedio \pm error estándar, n=6.

7.10 El pretratamiento con LPS-RS abatió el efecto antialodínico del A784168

El pretratamiento con una administración única de LPS-RS (10 μ g), justo antes del inicio de privación de sueño MOR durante 48 h, no impidió el desarrollo de alodinia mecánica (**Figura 19A**, PreTx LPS-RS + V). Sin embargo, en las ratas que recibieron pretratamiento con LPS-RS no se observó el efecto antialodínico del A784168 administrado como postratamiento a las concentraciones de 10 y 100 ng/10 μ l (**Figura 19A y B**). El análisis del ABC del efecto de A784168 en presencia o en ausencia de pretratamiento con LPS-RS (**Figura 19B**) sugiere que el bloqueo del receptor TLR4 previo a la privación de sueño MOR por 48 h eliminó el efecto antialodínico del A784168.

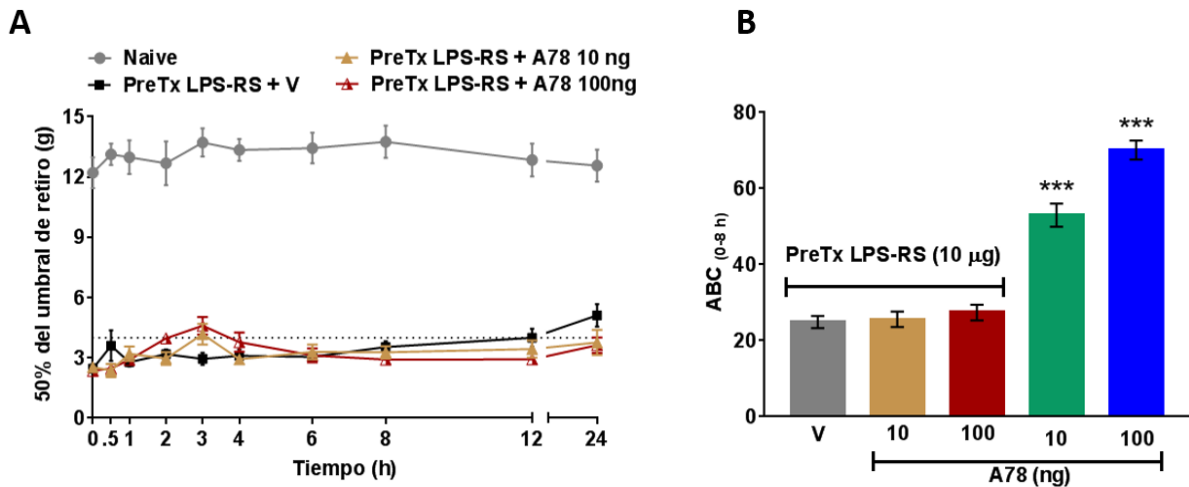


Figura 19. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre el efecto antialodínico del A784168 en animales con privación de sueño MOR. **A.** Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro de animales que recibieron pretratamiento con una administración de 10 μ g de LPS-RS justo al inicio de la privación de sueño MOR por 48 h y vehículo del A784168 (PreTx LPS-RS + V) y aquellos que recibieron un postratamiento con 10 o 100 ng de A784168 (PreTx LPS-RS + A78). **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. Con fines comparativos, se presenta el ABC del postratamiento con 10 o 100 ng de A784168 en animales sin pretratamiento con LPS-RS (A78). Los datos representan el promedio \pm error estándar, n=6. *** p < 0.001 contra el grupo PreTx LPS-RS + V, por ANOVA de una vía seguido de la prueba SNK.

El pretratamiento con una sola administración de LPS-RS 1 μg justo al inicio de la privación de sueño MOR, no abatió completamente el efecto antialodínico del postratamiento con 100 ng de A784168, a diferencia de lo observado cuando el pretratamiento consistió en 10 μg de LPS-RS (**Figura 20A y B**). Estos datos sugieren que el impacto del bloqueo del receptor TLR4 sobre el efecto antialodínico del antagonista del receptor TRPV1 es dependiente de la concentración.

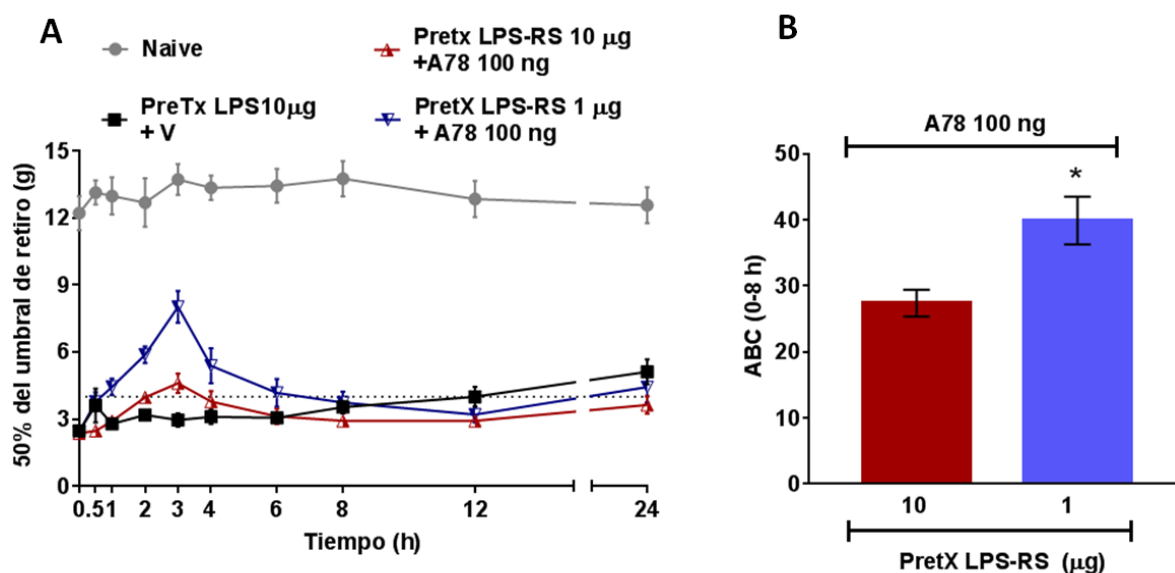


Figura 20. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre el efecto antinociceptivo del A784168. **A.** Curso temporal de los cambios en el umbral de retiro en animales que recibieron un pretratamiento con 1 o 10 μg de LPS-RS previo a un periodo de privación de sueño MOR por 48 h y un postratamiento con 100 ng de A784168 (PreTx LPS-RS + A78). **B.** ABC calculada a partir del curso temporal A. Los datos representan el promedio \pm error estándar, $n=6$. * $p < 0.05$ contra el grupo PreTx LPS-RS 10 μg + A78 100 ng por prueba de T de Student.

7.11 La privación de sueño MOR aumentó la expresión de HMGB1 en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal dorsal

La privación de sueño MOR aumentó la expresión de la proteína HMGB1 en los ganglios de la raíz dorsal de la región L4-L5 a partir de las 12 h y hasta las 48 h de privación de sueño. Posteriormente, la expresión de HMGB1 disminuyó a valores basales a partir del primer día de recuperación (**Figura 21A**). Por su parte, la expresión de HMGB1 en médula espinal dorsal aumentó desde las 12 h y hasta las 24 h de privación de sueño y posteriormente disminuyó a niveles semejantes a los basales a partir del segundo día de privación de sueño MOR (**Figura 21B**). Además, se observó una menor expresión de HMGB1 en la médula espinal dorsal respecto al ganglio de la raíz dorsal.

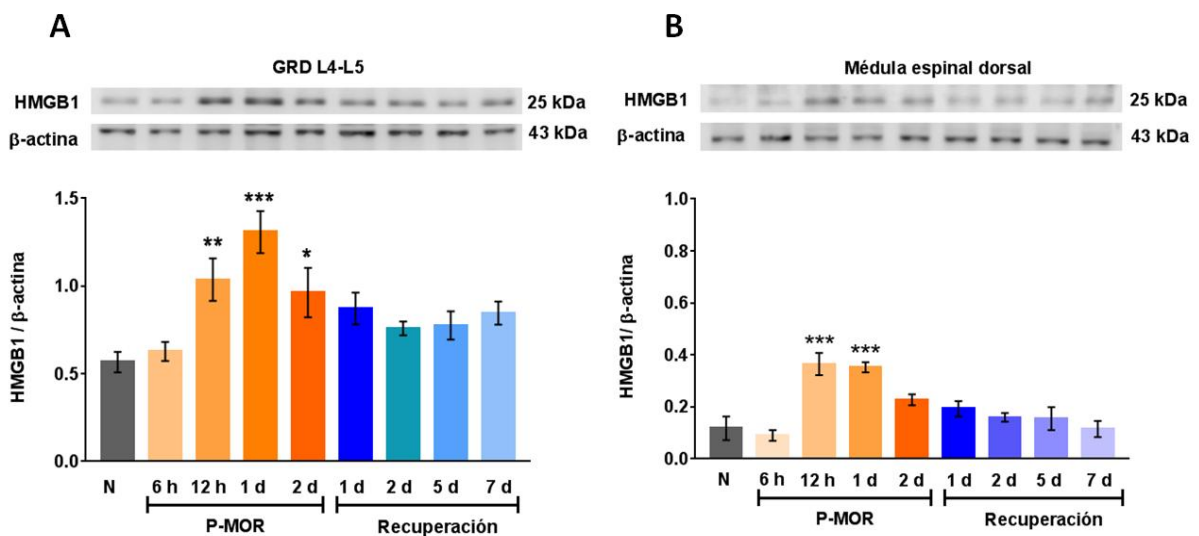


Figura 21. Cambios en la expresión de HMGB1 inducidos por privación de sueño MOR. Expresión de la proteína HMGB1 en **A**) ganglios de la raíz dorsal (GRD L4-L5) y **B**) médula espinal dorsal de ratas naïve (N), con 6 h, 12 h, 1 o 2 días de privación de sueño MOR (P-MOR) y con 1, 2, 5 o 7 días de recuperación. Se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. La cuantificación de la señal se expresa como índice de densidad óptica de HMGB1 / β actina. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ contra el grupo N por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnet. $n = 4$.

7.12 La privación de sueño MOR no modificó la expresión de TLR4 en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal dorsal

La privación de sueño MOR no modificó la expresión de la proteína del receptor TLR4 en los ganglios de la raíz dorsal de la región L4-L5, ni en la médula espinal dorsal de los animales expuestos a dicha condición (**Figura 22A y B**). Se observó una menor expresión del receptor TLR4 en los ganglios de raíz dorsal respecto a la médula espinal dorsal.

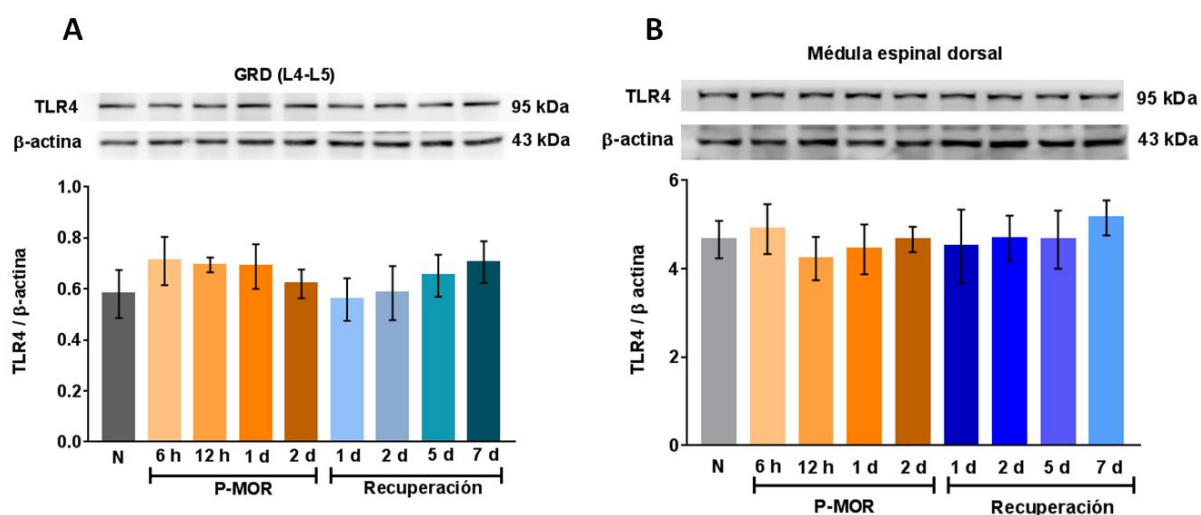


Figura 22. Efecto de la privación de sueño MOR sobre la expresión de TLR4. Expresión de la proteína del receptor TLR4 en **A**) ganglios de la raíz dorsal (GRD L4-L5) y **B**) médula espinal dorsal de ratas naïve (N), con 6 h, 12 h, 1 o 2 días de privación de sueño MOR (P-MOR) y con 1, 2, 5 o 7 días de recuperación. Se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. La cuantificación de la señal se expresa como índice de densidad óptica de TLR4 / β actina. $n = 4$.

7.13 La privación de sueño MOR aumentó la expresión de TRPV1 en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal dorsal

La privación de sueño MOR aumentó la expresión de la proteína del canal TRPV1 en los ganglios de la raíz dorsal L4-L5 a partir de las 12 h y hasta las 48 h de privación de sueño, regresando paulatinamente a valores basales durante el periodo de recuperación (**Figura 23A**). Por otra parte, se observó que la privación de sueño MOR incrementó la expresión de TRPV1 en la médula espinal dorsal a las 12 y 24 h de privación de sueño (**Figura 23B**). Adicionalmente, se observó una menor expresión del TRPV1 en la médula espinal dorsal respecto al ganglio de la raíz dorsal.

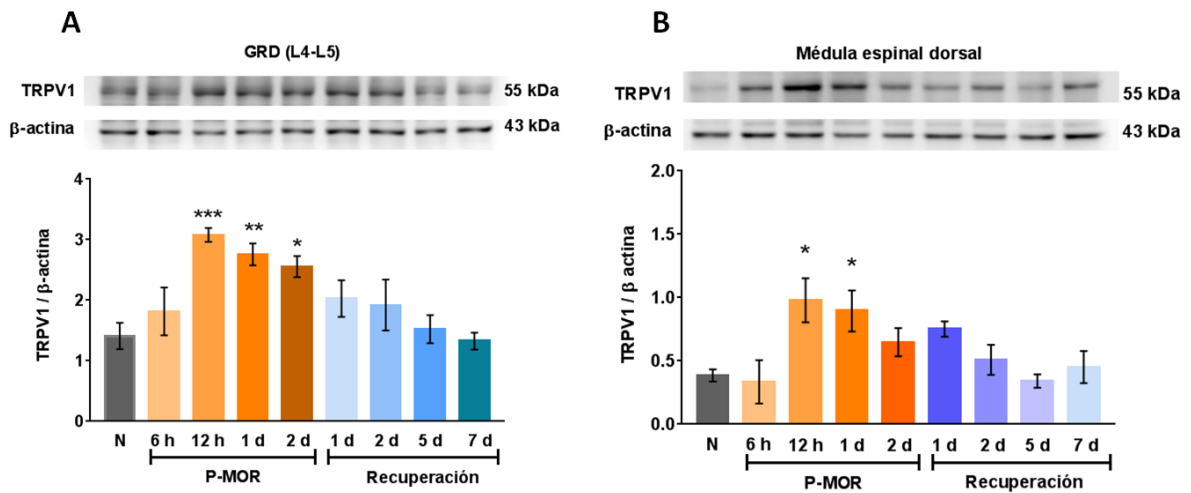


Figura 23. Cambios en la expresión de TRPV1 inducidos por privación de sueño MOR. Expresión de la proteína TRPV1 en **A**) ganglio de la raíz dorsal (GRD L4-L5) y **B**) médula espinal dorsal de ratas naïve (N), con 6 h, 12 h, 1 o 2 días de privación de sueño MOR (P-MOR) y con 1, 2, 5 o 7 días de recuperación. Se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. La cuantificación de la señal se expresa como índice de densidad óptica de TRPV1 / β actina. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ contra el grupo N, por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. $n = 4$.

7.14 El pretratamiento con LPS-RS atenuó el aumento en la expresión del canal TRPV1 en ratas sometidas a privación de sueño MOR

El pretratamiento con cuatro administraciones de LPS-RS (10 µg) vía intratecal 24 h antes del inicio de la privación de sueño MOR atenuó el incremento en la expresión del canal TRPV1 en los ganglios de la raíz dorsal (**Figura 24A**) y en la médula espinal (**Figura 24B**), respecto al que se observó en los animales que no recibieron el pretratamiento con LPS-RS. Los animales con pretratamiento con LPS-RS y sometidos a privación de sueño MOR de 12 a 48 h no mostraron diferencias significativas en la expresión de TRPV1 respecto a los animales intactos. Estos datos sugieren que el bloqueo de TLR4 reduce el aumento en la expresión de TRPV1 inducido por la privación de sueño MOR.

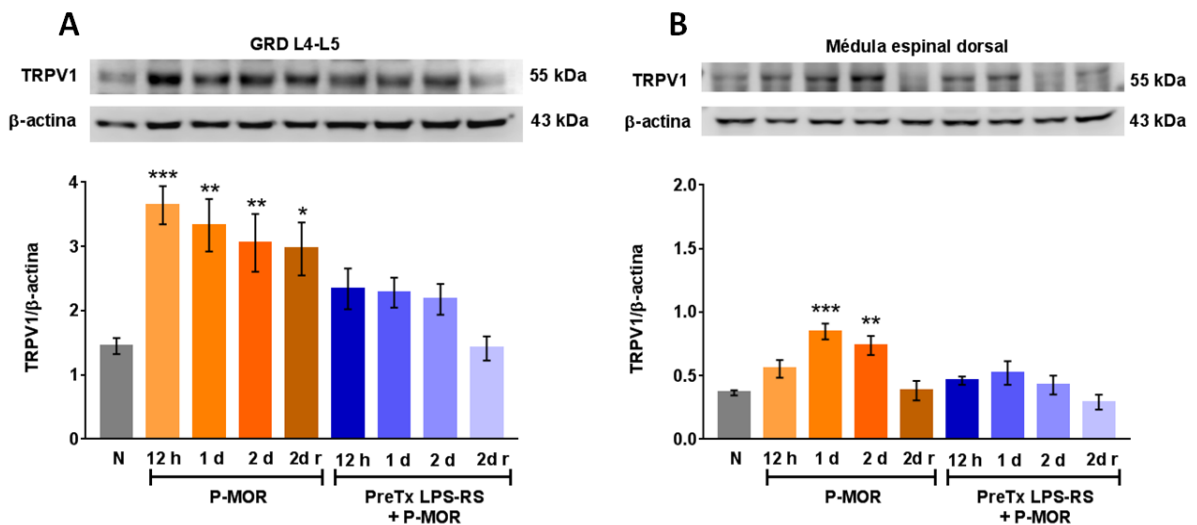


Figura 24. Efecto del pretratamiento con LPS-RS sobre la expresión de TRPV1 en ratas sometidas a privación de sueño MOR. Expresión de la proteína TRPV1 en **A)** ganglio de la raíz dorsal (GRD L4-L5) y **B)** médula espinal dorsal de ratas naïve (N), con 12 h, 1 o 2 días de privación de sueño MOR y 2 días de recuperación (2dr) sin (P-MOR) o con el pretratamiento con LPS-RS (PreTx LPS-RS + P-MOR). Se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. La cuantificación de la señal se expresa como índice de densidad óptica de TRPV1 / β actina. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ contra el grupo N, por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. $n = 4$.

8. DISCUSIÓN

8.1 Alteraciones de la nocicepción inducidas por la privación de sueño MOR y sus probables mecanismos generadores

En el presente trabajo se observó que la privación de sueño MOR a partir de 24 h disminuye el umbral de retiro ante la estimulación mecánica a niveles considerados como alodinia táctil en ratas tras 48 h de privación de sueño MOR. Existe una amplia cantidad de estudios en los que se ha reportado que la reducción o privación de sueño experimental en diferentes formatos, tanto en modelos animales como en seres humanos, exagera conductas nociceptivas (Lautenbacher et al., 2006; Andersen et al., 2018). De manera particular, existen varios estudios en los cuales la privación selectiva de sueño MOR induce efectos pronociceptivos tales como la reducción del umbral ante estimulación eléctrica en la cola (Hicks et al., 1978 y 1979), reducción de umbrales térmicos ante el calor y frío (Onen et al., 2001b; Harvey et al., 2010) aumento de conductas nociceptivas inducidas por formalina (Tomim et al., 2016) y reducción del umbral de retiro mecánico evaluado con presión de la pata y con filamentos de von Frey (Ukponmwan et al., 1984 y 1986; Onen et al., 2000; Wei et al., 2008; Tomim et al., 2016).

Asimismo, se observó que la reducción del umbral de retiro se presentó de manera similar en ambas extremidades traseras de las ratas, lo cual sugiere que la hipersensibilidad mecánica inducida por privación de sueño MOR es generalizada. Resultados similares se han reportado antes en otros trabajos, donde la privación de sueño MOR reduce los umbrales de retiro mecánico y térmico de forma generalizada en roedores (Ukponmwan et al., 1984 y 1986; Onen et al., 2000; Onen et al., 2001b; Wei et al., 2008; Tomim et al., 2016; Muñoz-Castillo, 2017) y en humanos (Onen et al., 2001a; Roehrs et al., 2006; Azevedo et al., 2011). En otros modelos de dolor disfuncional como el dolor inducido por restricción crónica de movimiento (Velázquez-Lagunas, 2017; Pluma-Pluma, 2019) y el dolor tipo fibromialgia (Wakatsuki et al. 2019; Fischer et al., 2020) se han reportado resultados similares.

Se sabe que el sexo es un factor que influye en la sensibilidad al dolor, su epidemiología y la respuesta a ciertos tratamientos antinociceptivos (Bartley y Fillingim, 2013), de ahí la importancia de evaluar posibles diferencias asociadas a este factor. En este estudio, la privación de sueño MOR redujo el umbral de retiro mecánico de forma similar en ambos sexos. Al respecto y en concordancia con nuestros datos, un estudio realizado en humanos por Eichhorn y colaboradores (2018) se centró en estudiar las posibles diferencias entre sexos en los cambios de umbrales nociceptivos inducidos por privación total de sueño. En ese estudio, los autores identificaron que una noche de privación total de sueño redujo los umbrales de nocicepción mecánica y la tolerancia a estímulos fríos de forma independiente al sexo. Sin embargo, los umbrales ante estimulación térmica caliente se redujeron únicamente en las mujeres, fenómeno que los autores asocian a una reducción de la capacidad endógena de inhibir el dolor en las mujeres sometidas a privación de sueño. De forma similar, un estudio realizado por Araujo y colaboradores (2011) reporta que 72 h de privación de sueño MOR o 15 días de restricción parcial de sueño en ratones, inducen un estado de hiperalgesia térmica en ambos sexos, pero se identificó que los umbrales térmicos se redujeron más en las hembras que en los machos.

Estas posibles diferencias entre sexos también se han estudiado en otros tipos de dolor con resultados contrastantes. Por ejemplo, en un modelo de dolor disfuncional tipo fibromialgia desarrollado por Nagakura y colaboradores (2009), se identificó que la administración repetida de reserpina, un fármaco que inhibe la actividad del transportador vesicular de monoaminas, induce alodinia táctil y dolor muscular de manera independiente al sexo. Ahora bien, aunque las evaluaciones conductuales arrojen resultados similares en machos y hembras, es posible que los mecanismos implicados presenten diferencias. Por ejemplo, se ha reportado la existencia de dimorfismos sexuales en los mecanismos que subyacen al desarrollo de hipersensibilidad mecánica en condiciones de dolor neuropático; mientras que en los machos el fenómeno depende principalmente de la participación de células de la microglía, en hembras las principales células implicadas son linfocitos T (Sorge et al., 2015). Tales discrepancias asociadas al sexo se pueden atribuir a

múltiples factores, desde los asociados a la especie, modelo de dolor utilizado o temporalidad e intensidad del estímulo aplicado, así como a factores biológicos como la influencia de las hormonas sexuales, dada la amplia distribución de las mismas y sus receptores en áreas del sistema nervioso central y periférico implicadas en la transmisión nociceptiva (Craft et al., 2004; Craft, 2007) y a interacciones de las hormonas gonadales con la regulación de las acciones del sistema opioide (Smith et al., 2006), por mencionar algunos.

Puesto que la mayoría de los estudios que evalúan la relación entre la privación de sueño y la nocicepción han sido de carácter descriptivo, los mecanismos que subyacen al desarrollo de hipersensibilidad al dolor generada por privación de sueño siguen siendo poco conocidos (Eichhorn et al., 2018; Andersen et al., 2018). Los primeros estudios mecanísticos apuntaron a una posible desregulación del sistema opioide como responsable de los efectos hiperalgésicos de la privación de sueño. Shapiro y Girdwood (1981) identificaron que la privación de sueño MOR reduce la síntesis de opioides endógenos. Ukponmwan y colaboradores (1984 y 1986) identificaron que los animales sometidos a privación de sueño MOR eran menos responsivos a los efectos analgésicos de opioides exógenos y que la acción antinociceptiva de los inhibidores de encefalinasas se pierde tras la privación de sueño. Posteriormente, se ha identificado una afinidad menor de los receptores mu y delta en estructuras límbicas de ratas sometidas a privación de sueño (Fadda et al., 1991).

Los sistemas de neurotransmisión opioide y monoaminérgicos están estrechamente relacionados e interactúan para regular diversas funciones entre las que se encuentra la nocicepción (Haack et al., 2020). Hay evidencia de que la privación de sueño MOR genera desregulación de los sistemas monoaminérgicos, principalmente el serotoninérgico, de tal forma que éste se vuelve incapaz de mantener la inhibición del dolor producida por la activación opioide (Haack et al., 2020). De hecho, se han reportado niveles reducidos de serotonina y sus metabolitos en los cerebros de ratas sometidas a privación de sueño MOR por 96 h (Farooqui et al., 1996; Blanco-Centurion y Salin-Pascual, 2001). Reforzando

tales hallazgos, Bjorvatn y colaboradores (2002) identificaron por microdiálisis *in vivo* una reducción gradual de serotonina extracelular a partir de 8 h de privación de sueño, tanto en la corteza frontal como en el hipocampo, dos áreas importantes con proyecciones serotoninérgicas provenientes del núcleo dorsal del rafe.

Se considera que los problemas relacionados con la falta o fragmentación de sueño tienen un factor de estrés de manera intrínseca, de tal forma que el estrés que acompaña a la privación de sueño juega un papel importante en el desarrollo de la hipersensibilidad al dolor (McEwen, 2006; Maggio et al., 2013; Hirotsu et al., 2015). Se sabe que el miedo o la identificación de amenazas inducen la secreción de catecolaminas simpáticas (adrenalina y noradrenalina) y glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores), que a corto plazo promueven la supervivencia al movilizar reservas de glucosa hacia la sangre y ejerciendo efectos antiinflamatorios; sin embargo, una respuesta al estrés exagerada o prolongada induce la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, un estado de inflamación generalizada y dolor (Hannibal y Bishop, 2014).

La relación entre el estrés y el desarrollo de hipersensibilidad al dolor se ha estudiado en diversos modelos en roedores. Por ejemplo, existe evidencia de que el estrés por separación materna en ratones neonatos reduce los umbrales de retiro mecánico y térmico en la vida adulta, abate los efectos antinociceptivos de la exposición a estrés agudo (Amini-Khoei et al., 2017) y exacerba la hipersensibilidad mecánica y térmica inducida por lesión a los nervios (Nishinaka et al., 2014). Por su parte, Nakamoto y colaboradores (2017) identificaron un aumento en la expresión de GFAP y activación astrocítica en el *Locus Coeruleus*, un área del tronco encefálico involucrada en las respuestas al pánico y al estrés, que se correlacionó con el desarrollo de alodinia mecánica en ratones sometidos a separación materna combinada con aislamiento social. De manera interesante, se ha descrito que este tipo de hipersensibilidad al dolor puede afectar incluso a la descendencia de animales sometidos a separación materna (Vilela et al., 2017).

En un modelo de estrés psicosocial, se ha identificado que los ratones expuestos a derrota social repetida desarrollan hiperalgesia térmica (Marcinkiewicz et al.,

2009) y alodinia mecánica (Sawicki et al., 2017 y 2018), lo que sugiere una regulación conjunta y mutuamente facilitadora entre las vías centrales que regulan el estrés y el dolor (Marcinkiewicz et al., 2009). Esta hipersensibilidad al dolor inducida por estrés psicosocial se ha asociado con inflamación mediada por la microglía, ya que se ha identificado un aumento en el ARNm de varios genes inflamatorios, incluidos IL-1, TNF- α , CCL2 y TLR4 en la médula espinal lumbar (Sawicki et al., 2018). Resultados análogos se han reportado también en un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento en ratas, donde la alodinia táctil presente en las ratas sometidas a estrés crónico se revierte con un inhibidor de la alarmina HMGB1, antagonistas del receptor TLR4 (Velázquez-Lagunas, 2017) y con un antagonista del receptor de TNF α (TNFR1) (Pluma-Pluma, 2019).

Finalmente, existen algunos reportes que identifican a las interacciones neuroinmunes entre células gliales y neuronas implicadas en la transmisión nociceptiva como posibles factores desencadenantes de estados de hipersensibilidad al dolor inducidos por la reducción de sueño (Hurtado-Alvarado et al., 2013; Nijs, 2017). Bajo esta perspectiva, en este trabajo se estudió la participación de un patrón molecular asociado a daño, la alarmina HMGB1 a través de la activación del receptor TLR4, ampliamente expresado en la microglía y astrocitos (Vaure y Liu, 2014), como posibles agentes reguladores de la expresión y función de uno de los principales canales iónicos integradores de señales nociceptivas, el TRPV1.

8.2 Participación de la alarmina HMGB1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

La proteína HMGB1 se expresa en el núcleo de prácticamente cualquier célula, donde regula la arquitectura cromosómica junto con las histonas (Ueda y Yoshida, 2010). En la actualidad se reconoce que HMGB1 funge también como una alarmina cuya secreción al medio extracelular ocurre de forma espontánea tras la muerte celular no apoptótica, o bien se secreta activamente en condiciones de daño celular, procesos inflamatorios o invasión por patógenos (Andersson y Tracey,

2011). Asimismo, HMGB1 tiene el potencial de actuar sobre diferentes familias de receptores de reconocimiento de patrones como los TLRs 2, 4 y 9, CD42, Siglec, RAGE y Mac 1 a través de los cuales contribuye a la activación de células inmunes, la inducción de la síntesis y la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiotaxis (Hori et al., 1995; Park et al., 2004; Ivanov et al., 2007; Orlova et al., 2007; Chen et al., 2009). Estos hallazgos han despertado el interés en estudiar la posible participación de HMGB1 en la transmisión nociceptiva y en diversas alteraciones de la nocicepción.

En el presente estudio se observó que la glicirricina, un fármaco que impide la unión de HMGB1 a receptores, revirtió la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR tanto en ratas hembras como macho. Adicionalmente, el pretratamiento con glicirricina atenuó el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica e impidió el desarrollo de alodinia táctil inducida por la privación de sueño MOR. Estos datos en conjunto nos permiten sugerir por primera vez la participación de la alarmina HMGB1 como un agente pronociceptivo en la fisiopatología de la alodinia mecánica inducida por privación de sueño MOR. En apoyo a nuestros hallazgos, diversos estudios han reportado previamente que la administración de HMGB1 exógena tiene efectos pronociceptivos. Por ejemplo, O'Connor y colaboradores (2003) identificaron que la administración de HMGB1 por vía intratecal en ratas redujo el umbral de retiro mecánico. También se ha reportado que la administración intratecal y periférica de HMGB1 sobre el nervio ciático induce alodinia mecánica en ratones hembras y machos (Shibasaki et al., 2010). Asimismo, algunos estudios señalan que el impedir las acciones de la alarmina HMGB1 secretada endógenamente tiene efecto antinociceptivo en modelos animales. Por ejemplo, algunos reportes indican que la glicirricina revierte parcialmente la alodinia mecánica presente en roedores con dolor neuropático (Feldman et al., 2012; Allette et al., 2014), mientras que, Velázquez-Lagunas (2017) demostró que la glicirricina revierte la alodinia mecánica inducida por estrés crónico por restricción de movimiento. De manera análoga, la administración de anticuerpos anti-HMGB1 (Shibasaki et al., 2010; Otoshi et al., 2011; Nakamura et al., 2013) o la administración de trombomodulina, una proteína endotelial capaz de

inducir la degradación de HMGB1 extracelular (Tanaka et al., 2013), revierten las acciones pronociceptivas de HMGB1.

En el presente trabajo se identificó mediante *Western blot* que HMGB1 se expresa de manera basal en los ganglios de raíz dorsal (L4-L5) y médula espinal dorsal de ratas intactas, y adicionalmente, la privación de sueño MOR aumentó la expresión de HMGB1 en ganglios de la raíz dorsal y la porción dorsal de la médula espinal. La inmunoreactividad basal de HMGB1 se ha reportado en neuronas, células satelitales, células de Schwann, microglía y astrocitos de ratas y ratones intactos (Shibasaki et al., 2010; Feldman et al., 2012; Nakamura et al., 2013; Agalave et al., 2014). Además, el aumento en la expresión del ARNm y la proteína de HMGB1 en dichas células, así como una movilización de la proteína del núcleo hacia el citoplasma, se ha reportado en diferentes modelos de dolor como la ligadura de nervios espinales (Shibasaki et al., 2010) o el daño al nervio tibial (Feldman et al., 2012). De manera interesante por tratarse de un modelo de dolor disfuncional (sin lesión a los nervios), Velázquez-Lagunas (2017) identificó que el estrés crónico por restricción de movimiento aumentó la expresión de HMGB1 en ganglio de la raíz dorsal y la porción dorsal de la médula espinal.

Respecto a los posibles mecanismos implicados en las acciones pronociceptivas de HMGB1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia mecánica observada en ratas con privación de sueño MOR es posible que sea a través de la unión de esta alarmina al receptor TLR4. Esta hipótesis se basa en el estudio realizado por Agalave y colaboradores (2014), en el cual se identificó que las acciones pronociceptivas a nivel espinal de HMGB1 dependen de su estado redox. Los autores identificaron que la inyección intratecal de HMGB1 disulfuro (forma afín al receptor TLR4), pero no de la forma HMGB1 tiol (forma afín a los receptores RAGE), induce efectos pronociceptivos y aumenta el ARNm de GFAP, TNF e IL-1, citocinas típicas de los estados de activación microglial y astrocítica. Asimismo, los efectos pronociceptivos y proinflamatorios de HMGB1 disulfuro se abolieron en ratones deficientes de TLR4, pero no en los animales deficientes de TLR2 o RAGE.

8.3 Participación del receptor TLR4 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

El receptor TLR4 es capaz de identificar PAMPs provenientes de bacterias, hongos, virus y protozoarios, así como señales endógenas de daño o estrés celular (DAMPs como la proteína HMGB1, las proteínas de choque térmico, los biglicanos, el ácido hialurónico y la beta defensina). A través del reconocimiento de estos ligandos, el TLR4 media la comunicación de lesiones tisulares al sistema inmune, la inducción de respuestas de reparación de daños y desencadena acciones ante infecciones (Vaure y Liu, 2014). Sin embargo, evidencia creciente indica que el TLR4 juega un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de diferentes patologías inflamatorias crónicas, sepsis, asma, cánceres, enfermedades autoinmunes y dolor patológico (Li et al., 2015a; Li et al., 2015b; Meng et al., 2017; Min et al., 2018; Wu et al., 2019; Martínez-García et al., 2020), por lo que estudiar su participación en tales afecciones coadyuva a la comprensión de su fisiopatología y sustenta el posible uso de moduladores de la activación y/o señalización del TLR4 como herramientas antinociceptivas (Bruno et al., 2018).

En el presente trabajo se identificó que la administración intratecal de LPS-RS, un lipopolisacárido de *Rhodobacter sphaeroides* que impide la activación y señalización del receptor TLR4 (Gaikwad y Agrawal-Rajput, 2015), revierte la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR, mientras que el pretratamiento con LPS-RS impidió el desarrollo de la alodinia. Estos datos permiten sugerir por primera vez que la activación del receptor TLR4 participa en el desarrollo y en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por la privación de sueño MOR ratas.

Adicionalmente, en el presente trabajo se identificó que el receptor TLR4 se expresa en condiciones basales en los ganglios de la raíz dorsal (L4 y L5) así como en la porción dorsal de la médula espinal lumbar. La expresión basal del receptor TLR4 en el sistema nervioso ha sido reportada previamente, en particular en macrófagos residentes y reclutados, microglía, astrocitos y neuronas

sensoriales (Olson y Miller, 2004; Wadachi y Hargreaves, 2006; Barajon, et al., 2009; Ohara et al., 2013; Vaure y Liu, 2014; Li et al., 2015a; Velázquez-Lagunas, 2017). La distribución del receptor TLR4 en estas células sugiere su participación en la transmisión nociceptiva a nivel espinal.

La privación de sueño MOR por 48 h no modificó la expresión de TLR4 ni en ganglios de la raíz dorsal ni en la médula espinal dorsal de la rata. En diversos trabajos y modelos de dolor se han evaluado cambios en la expresión de TLR4 con resultados heterogéneos. Por ejemplo, Hu y colaboradores (2018) reportaron que la expresión de TLR4 no cambia en la médula espinal tras la transección parcial del nervio infraorbital en ratones, pero identificaron un aumento en la expresión de la proteína adaptadora MYD88 y de TNF α , uno de los productos finales de la señalización por TLR4. En contraste, se ha reportado que la expresión del ARNm y/o la proteína del TLR4 así como sus proteínas adaptadoras MYD88 y TRIF, aumenta en el dolor inflamatorio inducido por la administración de adyuvante completo de Freund (Raghavendra et al., 2004), la constricción crónica del nervio ciático en ratones y ratas (Bettoni et al., 2008; Jurga et al., 2016), la lesión de la médula espinal (Chen et al., 2017), el estrés crónico por restricción de movimiento en rata (Velazquez-Lagunas, 2017) y el dolor neuropático asociado a diabetes (Jia et al., 2020). Las discrepancias respecto a los cambios en la expresión del receptor TLR4 podrían deberse a la diferente naturaleza de los estímulos aplicados como inductores de dolor en los diferentes modelos, así como a su severidad y duración.

Los posibles mecanismos por los que el receptor TLR4 podría participar en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia mecánica observada en ratas con privación de sueño MOR son varios. Una posibilidad implica la participación de células gliales. Se ha reportado que la glía espinal se activa en diversos estados fisiológicos alterados, liberando de forma persistente citocinas proinflamatorias como el TNF α , BDNF, IL-1 e IL-6, que a su vez conducen a la liberación de óxido nítrico, prostaglandinas, factores de crecimiento y aminoácidos excitadores que en conjunto favorecen la transmisión nociceptiva (Watkins y Maier, 2003). Hay

evidencia de que estos productos de secreción gliales refuerzan la transmisión sináptica excitatoria, particularmente la mediada por receptores NMDA, a la vez que suprimen la transmisión sináptica inhibitoria en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Coull et al., 2005; Kawasaki et al., 2008; Li et al., 2009; Ren y Torres, 2009). Además, el TNF α y el BDNF liberados por la glía se han identificado como inductores de potenciación a largo plazo en la médula espinal (Liu et al., 2007; Zhou et al., 2008; Zhou et al., 2011; Park et al., 2011).

La participación del receptor TLR4 en la sobreactivación glial y en el desarrollo de dolor patológico ha sido ampliamente reportada. Watkins y colaboradores (1997) reportaron que la administración intratecal de CN1-1493, un fármaco que impide la síntesis de citocinas en células derivadas de monocitos y la acción de algunos productos de secreción gliales (IL 1- β , NGF y TNF α), atenuó la hiperalgesia inducida por formalina en ratas. En el dolor neuropático de ratas y ratones se ha reportado la participación del TLR4 microglial en el desarrollo de hipersensibilidad térmica y mecánica (Tanga et al., 2005). Por su parte Bettoni y colaboradores (2008) reportaron que la administración repetida de un antagonista del TLR4 (FP-1) revirtió la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica en ratones con dolor neuropático, a la vez que redujo la activación del factor de transcripción NF- κ B y la sobreproducción de TNF α en la médula espinal. En otro estudio se reportó que la administración intratecal de agonistas del TLR4 (LPS y KDO2) induce un estado de alodinia mecánica generalizada y aumenta la secreción de TNF α desde la microglía en la rata, efectos que se atenúan mediante la administración de inhibidores de activación microglial como la minociclina y la pentoxifilina (Saito et al., 2010). Adicionalmente, se ha descrito la participación del TLR4 expresado en células gliales en el desarrollo del dolor artrítico (Abdollahi-Roodsaz et al., 2007), oncológico (Lan et al., 2010) y la hiperalgesia inducida por opioides (Ellis et al., 2016).

Aunque principalmente se ha descrito la participación del TLR4 glial en diferentes tipos de dolor, también es factible que el TLR4 que se expresa en neuronas esté implicado en el desarrollo y/o mantenimiento de la alodinia inducida por privación

de sueño MOR. Al respecto, algunos estudios en los que se ha identificado la expresión del TLR4 y otros TLRs en la membrana de neuronas sensoriales, sugieren su participación en la sensación de dolor (Wadachi y Hargreaves, 2006; Qi et al., 2011; Ferraz et al., 2011). Hasta la fecha no se ha estudiado a detalle si las vías de señalización inducidas tras la activación del TLR4 en neuronas son las mismas que están involucradas en la glía, pero se ha planteado la posibilidad de que las neuronas sensoriales primarias que expresan TLR4 posean la capacidad de detectar directamente PAMPs y DAMPs y que ello contribuya a enviar señales de advertencia al cerebro (Liu et al., 2012). De hecho, en este estudio se exploró la participación de la alarmina HMGB1 como un ligando del receptor TLR4, sin embargo, es posible que otras alarminas también puedan participar en la activación del TLR4 y participar en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil observada de ratas con privación de sueño MOR.

Finalmente, en nuestro estudio no se observaron diferencias del efecto antialodínico provocado por la administración del LPS-RS entre ratas machos y hembras. Estos datos contrastan con lo reportado por Sorge y colaboradores (2011) quienes observaron que la administración intratecal de LPS (agonista de TLR4) induce alodinia mecánica en ratones macho pero no en hembras. Asimismo, reportaron que las conductas nociceptivas en un modelo de dolor inflamatorio (por inyección de adyuvante completo de Freund) y neuropático (en el modelo Spared Nerve Injury) se atenúan con la administración intratecal del LPS-RS únicamente en los machos. Tal discrepancia podría deberse por un lado a que el estudio de Sorge y colaboradores (2011) se realizó en ratones y en nuestro caso se utilizaron ratas. También es posible que los mecanismos neurobiológicos implicados en la generación de dolor inflamatorio y neuropático (en los cuales hay un componente de daño al nervio o bien una respuesta inflamatoria a un agente farmacológico) son diferentes de aquellos que están involucrados en la inducción de alodinia mecánica por privación de sueño MOR, el cual se considera un modelo de dolor disfuncional. De hecho, Velazquez-Lagunas (2017) observó que el efecto de C-34, un antagonista del receptor TLR4, tuvo un efecto antialodínico similar en ratas hembras y machos sometidas a estrés crónico por restricción de movimiento.

8.4 Participación del canal TRPV1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR

El canal TRPV1 es un integrador de estímulos físicos, químicos y mecánicos importante en la transmisión nociceptiva, tanto en el dolor nociceptivo e inflamatorio, así como en el dolor neuropático y disfuncional asociado a varias patologías (Andreev et al., 2013; Mickle et al., 2016; Wouters et al., 2016).

En el presente estudio se identificó que la administración intratecal de A784168, un antagonista selectivo del canal TRPV1, revirtió la alodinia táctil inducida por 48 h de privación de sueño MOR con un efecto similar tanto en ratas hembras y machos. Este dato confirma lo reportado previamente por Muñoz-Castillo (2018) y permite sugerir que el canal TRPV1 está implicado en el mantenimiento de la alodinia táctil observada en ratas con privación de sueño MOR. La selectividad y eficacia del A784168 para antagonizar al TRPV1 ha sido ampliamente caracterizada tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de dolor inflamatorio y neuropático (Cui et al., 2006; Winston et al., 2007; Mills et al., 2013; Martínez-Rojas et al., 2014). También se ha reportado que los antagonistas de TRPV1 son efectivos para reducir la hipersensibilidad colónica en un modelo de síndrome de intestino irritable en ratas, otro tipo de dolor disfuncional (Winston et al., 2007). Adicionalmente, en contraste con lo observado en los esquemas de pretratamiento con glicirricina y LPS-RS, el pretratamiento con administraciones repetidas de A784168 no impidió el desarrollo de alodinia mecánica en ratas expuestas a 48 h de privación de sueño MOR. Este resultado sugiere que el canal TRPV1 participa en el mantenimiento, pero no en el desarrollo de la alodinia táctil observada en ratas con privación de sueño MOR.

En este trabajo se identificó mediante *Western blot* que el TRPV1 se expresa de manera basal en ganglios de la raíz dorsal y en la porción dorsal de la médula espinal lumbar. Previamente se ha reportado la expresión de TRPV1 en neuronas nociceptoras de tamaño pequeño y mediano en los ganglios de la raíz dorsal, ganglio trigeminal, ganglio nodal y ganglios simpáticos, así como en fibras C peptidérgicas y no peptidérgicas y en algunas fibras A δ , tanto en las ramas

periféricas como en las centrales del axón (Guo et al., 1999; Carlton y Coggeshall, 2001; Valtschanoff et al., 2001; Hwang et al., 2005; Cavanaugh et al., 2009; Huang et al., 2012). A nivel espinal TRPV1 se expresa en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal, tanto a nivel presináptico como postsináptico, donde el TRPV1 modula la transmisión de las señales nociceptivas (Spicarova y Palecek, 2009).

La privación de sueño MOR de entre 12 a 48 h aumentó la expresión de TRPV1 en los ganglios de la raíz dorsal L4-L5 y en la médula espinal dorsal. Este resultado se corresponde con lo reportado previamente en modelos de dolor inflamatorio y neuropático donde se ha identificado aumento en la expresión del TRPV1 en las mismas estructuras (Fukuoka et al., 2002; Li et al., 2014). También se ha descrito que en el dolor neuropático el TRPV1 aumenta su expresión en la corteza cingulada anterior y otras áreas del cerebro, facilitando la transmisión glutamatérgica en neuronas implicadas en la integración nociceptiva (Marrone et al., 2017). Por otra parte, se ha identificado que en biopsias de tejidos de pacientes humanos con enfermedad inflamatoria intestinal hay una sobreexpresión de TRPV1, que correlaciona con la gravedad de la hipersensibilidad dolorosa (Hicks, 2006).

Es posible que además de los cambios observados en la expresión del canal TRPV1, la privación de sueño MOR también induzca cambios en los mecanismos que regulan la función del canal. Al respecto, se sabe que el principal mecanismo de regulación de la actividad del TRPV1 es la fosforilación (Joseph et al., 2019). TRPV1 contiene en su extremo amino terminal sitios de fosforilación para proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) que en conjunto reducen su umbral de activación (Moiseenkova-Bell et al., 2008). También el extremo carboxilo terminal contiene varios sitios de interacción con ligandos citosólicos, como los dominios de unión a fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2), calmodulina y PKC (Numazaki et al., 2002). En algunos tipos de dolor se ha identificado aumento en las moléculas que sensibilizan al TRPV1 mediante fosforilación. Por ejemplo, Malek y colaboradores

(2015), identificaron que aumenta la coexpresión del TRPV1 con la proteína cinasa C épsilon (PKC ϵ) durante el desarrollo del dolor neuropático por constricción crónica del nervio ciático en ratones. Entretanto, se ha reportado que la inhibición de la actividad de la PKC y de otras cinasas mediante la administración de quercetina, atenúa el dolor neuropático (Gao et al., 2016).

Además de su activación directa por ligandos endógenos o exógenos y su regulación por fosforilación, la actividad del canal TRPV1 también se modula por algunos mediadores inflamatorios que influyen sobre la expresión membranar del canal. Por ejemplo, existe evidencia de que el factor de crecimiento neuronal (NGF) induce sensibilización del TRPV1 a través de la activación de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K), la cual facilita la inserción del canal en la membrana plasmática y activa a la cinasa Src, otra de las cinasas que fosforila directamente al TRPV1 (Zhang et al., 2005). De manera análoga, se ha reportado que la insulina y los factores de crecimiento parecidos a la insulina aumentan la expresión membranar del TRPV1 mediante la activación de la PI3K (van Buren et al., 2005). En este sentido, la información recabada en este estudio se podría ampliar mediante la caracterización de posibles cambios en el nivel de fosforilación del TRPV1 (por ejemplo, detectando mediante inmunnoblot su forma fosforilada) y evaluando los posibles cambios en su expresión membranar e intracelular mediante inmunohistoquímica.

8.5 Participación del receptor TLR4 en la regulación de la función y expresión del canal TRPV1 durante la privación de sueño MOR.

En este estudio se identificó por primera vez que el bloqueo farmacológico del receptor TLR4 previo a la privación de sueño MOR elimina el efecto antialodínico del antagonista del canal TRPV1. Asimismo, se identificó que el pretratamiento con administraciones repetidas de LPS-RS atenuó la sobreexpresión de TRPV1 en los ganglios de la raíz dorsal y en la médula espinal de ratas expuestas a 48 h de privación de sueño MOR. Estos datos, inéditos hasta ahora, sugieren que la activación del receptor TLR4 participa en la regulación de la función y media los

cambios en la expresión del canal TRPV1 observados en ratas con privación de sueño MOR.

Previamente se ha sugerido que existe una interacción entre el receptor TLR4 y el canal TRPV1. Wadachi y Hargreaves (2006) identificaron la coexpresión del receptor TLR4, su correceptor CD14 y el canal TRPV1 en neuronas nociceptivas del ganglio trigeminal de rata y humano, planteando la posibilidad de que el dolor asociado a infecciones odontológicas podría deberse a la activación directa de nociceptores por productos bacterianos como el LPS. Posteriormente se demostró que la activación del TLR4 con su agonista LPS, aumenta la expresión del TRPV1 y favorece las corrientes de calcio asociadas a la apertura del TRPV1 en cultivos primarios de neuronas trigeminales (Diogenes et al., 2011), asimismo, la activación del TLR4 estimula la secreción de CGRP dependiente de TRPV1 en cultivos de neuronas sensoriales (Ferraz et al., 2011).

Por otra parte, también se ha reportado coexpresión de TLR4 y TRPV1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal la (Li et al., 2015a). En un modelo de dolor neuropático inducido con paclitaxel (quimioterapéutico que funge como agonista del TLR4) se identificó un aumento en la expresión del canal TRPV1 que contribuye al dolor inducido por quimioterapia, el cual se revierte mediante la administración de antagonistas del receptor TLR4 (Li et al., 2015a; Li et al., 2015b). Resultados análogos fueron obtenidos por Wu y colaboradores (2019), quienes identificaron que las corrientes asociadas a la apertura del TRPV1 evocadas por capsaicina aumentan tras la administración de LPS en cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal provenientes de animales silvestres, pero no en los provenientes de ratones TLR4-KO.

De manera muy interesante, se ha reportado que el dominio intracelular TIR del receptor TLR4 permite una interacción directa con el canal TRPV1, mientras que su activación repetida con capsaicina aumenta la internalización y degradación lisosomal del canal en cultivos provenientes de animales silvestres, pero no en los cultivos provenientes de animales TLR4-KO (Min et al., 2018).

Existe evidencia de que la activación del TLR4 desencadena la activación de la cinasa PKC (Gangloff, 2012; Kawasaki y Kawai, 2014; Roy et al., 2016), una de las cinasas que estimula la actividad del canal TRPV1 en neuronas nociceptivas (Numazaki et al., 2002; Moiseenkova-Bell et al., 2008). Es posible que este mecanismo pudiera estar implicado en la relación que observamos entre el bloqueo del TLR4 y la pérdida del efecto del antagonista del TRPV1. Por ejemplo, se ha reportado que la inhibición de la actividad de la PKC reduce la activación del TRPV1 y esto atenúa el dolor neuropático inducido por paclitaxel (Gao et al., 2016).

Es importante resaltar que los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia por primera vez la participación de la vía de señalización HMGB1-TLR4 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia mecánica observada en los animales expuestos a privación de sueño MOR y que también es la primera vez que en un modelo de dolor disfuncional se tiene evidencia de la posible interacción entre el receptor TLR4 y el canal TRPV1. Los datos obtenidos permiten sugerir que la activación de TLR4 modula la función y expresión de TRPV1, puesto que el bloqueo del TLR4 inhibe el efecto antialodínico del antagonista del canal y atenúa el aumento en la expresión de TRPV1 en ganglio de raíz dorsal y médula espinal dorsal inducido por la privación de sueño MOR.

Los resultados del presente estudio dejan abierta la tarea de averiguar si la mediación del TLR4 sobre la actividad y expresión del TRPV1 es directa (a través de la activación del TLR4 neuronal) o indirecta (a través de la activación del TLR4 en células gliales), así como los mecanismos específicos implicados en tal regulación. En cualquier caso, comprender cómo modular la interacción entre TLR4 con sus ligandos y los eventos subcelulares que secundan su activación, puede contribuir al desarrollo de nuevos fármacos prometedores para el tratamiento de numerosas patologías (Martínez-García et al., 2020).

9. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos sugieren que la alarmina HMGB1 y la activación del receptor TLR4 participan en el desarrollo de la alodina táctil inducida por privación de sueño MOR, mientras que ambas proteínas además del canal TRPV1 participan en el mantenimiento del fenómeno. Se identificó que la privación de sueño MOR aumentó la expresión de HMGB1 y del canal TRPV1 en los ganglios de la raíz dorsal y en la porción dorsal de la médula espinal. Finalmente, proponemos que la señalización mediada por el receptor TLR4 tiene un papel regulador de la función y expresión del canal TRPV1 en el modelo estudiado.

Tomados en conjunto, los resultados de este estudio permiten sugerir que el uso de antagonistas o moduladores de la señalización del receptor TLR4 tiene un potencial uso terapéutico para las condiciones de hipersensibilidad al dolor generadas por trastornos del sueño.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar si la privación de sueño MOR tiene efecto sobre el estado de fosforilación de TRPV1 mediante la inmunodetección de la forma fosforilada del canal.
- Caracterizar mediante inmunohistoquímica la localización celular y subcelular de HMGB1, TLR4 y TRPV1 en ganglio de la raíz dorsal y médula espinal, así como los posibles cambios que esta pueda presentar en ratas sometidas a privación de sueño MOR.
- Indagar posibles cambios en la activación del receptor TLR4 mediante la detección por *Western blot* del complejo TLR4/MD-2 o de la proteína MYD88.
- Evaluar mediante electrofisiología los posibles cambios en las propiedades excitables de neuronas del ganglio de raíz dorsal inducidos por la privación de sueño MOR en ratas, así como la participación del receptor TLR4 en tales cambios.

11. REFERENCIAS

- Abdollahi-Roodsaz S, Joosten L, Roelofs M, Radstake T, Matera G, Popa C, van der Meer J, Netea M, van den Berg W. (2007) Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis and Rheumatology*; 56(9): 2957-2967.
- Afolalu E, Ramlee F, Tang N. (2018) Effects of sleep changes on pain-related health outcomes in the general population: a systematic review of longitudinal studies with exploratory meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*; 39: 82-97.
- Agalave N, Larsson M, Abdelmoaty S. (2014) Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis. *Pain*; 155: 1802-1813.
- Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. (2000) Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*; 164 (7): 3471-3475.
- Allette Y, Due M, Wilson S. (2014) Identification of a functional interaction of HMGB1 with receptor for advanced glycation end-products in a model of neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*; 42: 169-177.
- American Academy of Sleep Medicine. (2014) International classification of sleep disorders. 3rd ed. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine.
- American Academy of Sleep Medicine. (2007) The AASM manual 2007 for the scoring of sleep and associated events rules, terminology and technical specifications. Westchester, IL. American Academy of Sleep Medicine.
- Amini-Khoei H, Amiri S, Mohammadi-Asl A, Alijanpour S, Poursaman S, Haj-Mirzaian A, Rastegar M, Mesdaghinia A, Banafshe HR, Sadeghi E, Samiei E, Mehr SE, Dehpour AR. (2017) Experiencing neonatal maternal separation increased pain sensitivity in adult male mice: Involvement of oxytocinergic system. *Neuropeptides*; 61: 77-85.
- Andersen M, Araujo P, Frange C, Tufik S. (2018) Sleep disturbance and pain, a tale of two common problems. *Chest*; 154(5): 1249-1259.
- Andersson U, Tracey K. (2011) HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual Review of Immunology*; 29: 139-162.
- Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey K. (2002) HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *Journal of Leukocyte Biology*; 72:1084-1091.
- Andreev Y, Kozlov S, Korolkova Y, Dyachenko I, Bondarenko D, Skobtsov D, Murashev A, Kotova P, Rogachevskaja O, Kabanova N, Kolesnikov S, Grishin E. (2013) Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia. *Marine Drugs*; 11(12): 5100-5115.

- Araujo P, Mazaro-Costa R, Tufik S, Andersen M. (2011) Impact of sex on hyperalgesia induced by sleep loss. *Hormones and Behavior*; 59: 174-179.
- Austin P, Moalem-Taylor G. (2010) The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *Journal of Neuroimmunology*; 229: 26-50.
- Azevedo E, Manzano G, Silva A, Martins R, Andersen M, Tufik S. (2011) The effects of total and REM sleep deprivation on laser-evoked potential threshold and pain perception. *Pain*; 152: 2052-2058.
- Barajon I, Serrao G, Arnaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsari A, Rumio C. (2009) Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 57: 1013-1023.
- Bartley E, Fillingim R. (2013) Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British Journal of Anaesthesia*; 111: 52-58.
- Basbaum A, Bautista D, Scherrer G, Julius D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*; 139: 267-284.
- Bettoni I, Comelli F, Rossini C, Granucci F, Giagnoni G, Peri F, Costa B. (2008) Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia*; 56(12): 1312-1319.
- Bevan S, Quallo T, Andersson D. (2014) TRPV1. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 222: 207-245.
- Beyak M, Vanner S. (2005) Inflammation-induced hyperexcitability of nociceptive gastrointestinal DRG neurons: the role of voltage gated ion channels *Neurogastroenterology and Motility*; 17: 175-186.
- Bianchi M. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*; 81: 1-5.
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde D, Brandi I. (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*; 134: 845-852.
- Bjorvatn B, Gronli J, Hamre F. (2002) Effects of sleep deprivation on extracellular serotonin in hippocampus and frontal cortex of the rat. *Neuroscience*; 113: 323-330.
- Bjurstrom M, Giron S, Griffis C. (2016) Cerebrospinal fluid cytokines and neurotrophic factors in human chronic pain populations: a comprehensive review. *Pain Practice*; 16: 183-203.

- Blanco-Centurion C, Salin-Pascual R. (2001) Extracellular serotonin levels in the medullary reticular formation during normal sleep and after REM sleep deprivation. *Brain Research*; 923: 128-136.
- Bourinet E, Altier C, Hildebrand M, Trang T, Salter M, Zamponi G. (2014) Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiological Reviews*; 94: 81-140.
- Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H. (2007) Dissection of the components for PIP₂ activation and thermosensation in TRP channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104: 10246-10251.
- Bruno K, Woller S, Miller Y, Yaksh T, Wallace M, Beaton G, Chakravarthy K. (2018) Targeting toll-like receptor-4 (TLR4) an emerging therapeutic target for persistent pain states. *Pain*; 159(10): 1908-1915.
- Campana L, Bosurgi L, Bianchi M, Manfredi A, Rovere-Querini P. (2009) Requirement of HMGB1 for stromal cell-derived factor-1/CXCL12-dependent migration of macrophages and dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*; 86: 609-615.
- Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*; 504: 113-118.
- Carlton S, Coggeshall R. (2001) Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neuroscience Letters*; 310: 53-56.
- Carnevale V, Rohacs T. (2016) TRPV1: a target for rational drug design. *Pharmaceuticals Basel*; 9(3): E52.
- Caterina M, Julius D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *The Annual Review of Neuroscience*; 24: 487-517.
- Caterina M, Leffler A, Malmberg A, Martin W, Trafton J, Petersen-Seitz K, Koltzemburg M, Basbaum A, Julius D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*; 288(5464): 306-313.
- Caterina M, Schumacher, Tominaga M, Rosen M, Levine T, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*; 389: 816-824.
- Cavanaugh D, Chesler A, Jackson A, Sigal Y, Yamanaka H, Grant R. (2011) TRPV1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *Journal of Neuroscience*; 31: 5067-5077.
- Cavanaugh D, Lee H, Lo L, Shields S, Zylka M, Basbaum A. (2009) Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America; 106: 9075-9080.

- Chacur M, Milligan E, Gazda L. (2001) A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain*; 94: 231-244.
- Chan J, Roth J, Oppenheim J. (2012) Alarmins: awaiting a clinical response. *Journal of Clinical Investigation*; 122: 2711-2719.
- Chaplan S, Bach F, Pogrel J, Chung J, Yaksh T. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*; 53(1): 55-63.
- Chattu V, Manzar D, Kumary S, Burman D, Warren D, Pandi-Perumal S. (2018) The global problem of insufficient sleep and its serious public health implications. *Healthcare*; 7: 1-18.
- Chen G, Tang J, Zheng P, Liu Y. (2009) CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*; 323: 1722-1725.
- Chen J, Wang Z, Zheng Z, Chen Y, Khor S, Shi K, He Z, Wang Q, Zhao Y, Zhang H, Li X, Li J, Yin J, Wang X, Xiao J. (2017) Neuron and microglia/macrophage-derived FGF10 activate neuronal FGFR2/PI3K/Akt signaling and inhibit microglia/macrophages TLR4/NF- κ B-dependent neuroinflammation to improve functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death and Disease*; 8(10): e3090.
- Chen L, Fu W, Zheng L, Wang Y, Liang G. (2018) Recent progress in the discovery of myeloid differentiation 2 (MD-2) modulators for inflammatory diseases. *Drug Discovery Today*; 23(6): 1187-1202.
- Christianson C, Dumlao D, Stokes J, Dennis E, Svensson C, Corr M, Yaksh T. (2011) Spinal TLR4 mediates the transition to a persistent mechanical hypersensitivity after the resolution of inflammation in serum-transferred arthritis. *Pain*; 152(12): 2881-2891.
- Cirelli C, Tononi G. (2008) Is sleep essential? *PLOS Biology*; 6(8): 1605-1611.
- Clapham D. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*; 426: 517-524.
- Cohen M, Quintner, Rysewyk S. (2018) Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. *PAIN reports*; 3(2): e634.
- Costigan M, Woolf C. (2000) Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*; 1(3): 35-44.

- Costigan M, Scholz J, Woolf C. (2009) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*; 32: 1-32.
- Coull J, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K. (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*; 438(7070): 1017-1021.
- Craft R. (2007) Modulation of pain by estrogens. *Pain*; 132: S3-S12.
- Craft R, Mogil J, Aloisi A. (2004) Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *European Journal of Pain*; 8(5): 397-411.
- Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt E, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands T, Moreland R, Decker M, Lee C, Sullivan J, Faltynek C. (2006) TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *The Journal of Neuroscience*; 26(37): 9385-9393.
- Damasceno F, Skinner G, Araujo P. (2013) Nitric oxide modulates the hyperalgesic response to mechanical noxious stimuli in sleep-deprived rats. *BMC Neuroscience*; 14: 92.
- Davis J, Gray J, Gunthorpe M, Hatcher J, Davey P, Overend P. (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*; 405: 183-187.
- Di Marzo V, Blumberg P, Szallasi A. (2002). Endovanilloid signaling in pain. *Current Opinion in Neurobiology*; 12: 372-379.
- Diekelmann S, Born J. (2010) The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*; 11: 114-126.
- Diogenes A, Ferraz C, Akopian A, Henry M, Hargreaves K. (2011) LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *Journal of Dental Research*; 90: 759-764.
- Dixon W. (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 20: 441-462.
- Dumitriu I, Baruah P, Valentinis B, Voll R, Herrmann M, Nawroth P, Arnold B, Bianchi M, Manfredi A, Rovere-Querini P. (2005) Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Immunology*; 174: 7506-7515.
- Eban-Rothschild A, Appelbaum L, De Lecea L. (2018) Neuronal mechanisms for sleep/wake regulation and modulatory drive. *Neuropsychopharmacology*; 43(5): 937-952.
- Edwards R, Almeida D, Klick B, Haythornthwaite J, Smith M. (2008) Duration of sleep contributes to next-day pain report in the general population. *Pain*; 137(1): 202-207.

- Eichhorn N, Treede R, Schuh-Hofer S (2018) The role of sex in sleep deprivation related changes of nociception and conditioned pain modulation. *Neuroscience*; 387: 191-200.
- Ellis A, Grace P, Wieseler J, Favret J, Springer K, Skarda B, Ayala M, Hutchinson M, Falci S, Rice K, Maier S, Watkins L. (2016) Morphine amplifies mechanical allodynia via TLR4 in a rat model of spinal cord injury. *Brain, Behavior, and Immunity*; 58: 348-356.
- Fadda P, Tortorella A, Fratta W. (1991) Sleep deprivation decreases mu and delta opioid receptor binding in the rat limbic system. *Neuroscience Letters*; 129: 315-317.
- Faraut B, Nakib S, Drogou C, Elbaz M, Sauvet F, De Bandt J, Léger D. (2015) Napping reverses the salivary interleukin-6 and urinary norepinephrine changes induced by sleep restriction. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 100(3): E416-E426.
- Farooqui S, Brock J, Zhou J. (1996) Changes in monoamines and their metabolite concentrations in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*; 54: 385-391.
- Feldman P, Due M, Ripsch M, Khanna R, White F. (2012) The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain. *Journal of Neuroinflammation*; 9:180-198.
- Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf C, Devesa I, Ferrer-Montiel A. (2014) Trafficking of thermo TRP channels. *Membranes*; 4: 525-564.
- Ferraz C, Henry M, Hargreaves K, Diogenes A. (2011) Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *Journal of Endodontics*; 37(1): 45-48.
- Ferrini F, De Koninck Y. (2013) Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plasticity*; 2013: 429815.
- Finan P, Goodin B, Smith M. (2013) The association of sleep and pain: an update and a path forward. *The Journal of Pain*; 14(12): 1539-1552.
- Fischer S, Brusco I, Brum E, Fialho M, Camponogara C, Scussel R, Machado-de-Ávila R, Trevisan G, Oliveira SM. (2020) Involvement of TRPV1 and the efficacy of α -spinasterol on experimental fibromyalgia symptoms in mice. *Neurochemistry International*; 134: 104673.
- Fleig A, Penner R. (2004). The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends in Pharmacological Sciences*; 25: 633-639.
- Fong A, Schug A. (2014) Pathophysiology of pain: a practical primer. *Plastic and Reconstructive Surgery Journal*; 134(4S-2): 8-14.

- Foo H, Mason P. (2003) Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep Medicine Reviews*; 7: 145-154.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. (2002) VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain*; 99:111-120.
- Gaikwad S, Agrawal-Rajput R. (2015) Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* attenuates microglia-mediated inflammation and phagocytosis and directs regulatory T cell response. *International Journal of Inflammation*; 361326.
- Gangloff M. (2012) Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends in Biochemical Sciences*; 37(3): 92-98.
- Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. (2017) Inhibition of Toll-Like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A Journal from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*; 8: 508.
- Gao W, Zan Y, Wang Z, Hu X, Huang F. (2016) Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKC epsilon-dependent activation of TRPV1. *Acta Pharmacologica Sinica*; 37: 1166-1177.
- Garay-Malpartida H, Mantovani M, Santos I, Sogayar M, Goldberg A. (2011) Toll like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunology*; 2011:12.
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D. (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle mediated secretory pathway. *EMBO Reports*; 3: 995-1001.
- Gees M, Colsoel B, Nilius B. (2010) The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*; 10: a003962.
- Gondokaryono S, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana S, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. (2007) The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via Toll-like receptor 4. *Journal of Leukocyte Biology*; 82: 657-665.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neurosciences*; 11: 946-958.
- Haack M, Lee E, Cohen D, Mullington J. (2009) Activation of the prostaglandin system in response to sleep loss in healthy humans: Potential mediator of increased spontaneous pain. *Pain*; 145: 136-141.

- Haack M, Simpson N, Sethna N, Kaur S, Mullington J. (2020) Sleep deficiency and chronic pain: potential underlying mechanisms and clinical implications. *Neuropsychopharmacology*; 45(1): 205-216.
- Hannibal K, Bishop M. (2014) Chronic stress, cortisol dysfunction and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. *Physical Therapy*; 94(12):1816-1825.
- Harvey M, Kline R, May M, Roberts C, Valdovinos M, Wiley R, Kennedy C. (2010) Parametric analysis of thermal preference following sleep deprivation in the rat. *Neuroscience Letters*; 485: 98-101.
- Hayashi Y, Kashiwagi M, Yasuda K, Ando R, Kanuka M, Sakai K, Itohara S. (2015) Cells of a common developmental origin regulates REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science*; 350: 957-961.
- Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano-Moriello A, Lutz B, Di Marzo V. (2003) Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 60: 607-616.
- Hicks G. (2006) TRP channels as therapeutic targets: hot property, or time to cool down? *Neurogastroenterology and Motility*; 18: 590-594.
- Hicks R, Coleman D, Ferrante F, Sahatjian M, Hawkins J. (1979) Pain thresholds in rats during recovery from REM sleep deprivation. *Perceptual and Motor Skills*; 48: 687-90.
- Hicks R, Moore J, Findley P, Hirshfield C, Humphrey V. (1978) REM sleep deprivation and pain thresholds in rats. *Perceptual and Motor Skills*; 47: 848-850.
- Hirotsu C, Tufik S, Andersen M. (2015) Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Science*; 8(3): 143-152.
- Ho K, Ward N, Calkins D. (2012) TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *American Journal of Neurodegenerative Disease*; 1(1): 1-14.
- Hori O, Brett J, Slattery T. (1995) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *Journal of Biological Chemistry*; 270: 25752-25761.
- Hu T, Wang R, Tang Y, Wu Y, Yu J, Hou W, Lou G, Zhou Y, Zhang S, Chen Z. (2018) TLR4 deficiency abrogated widespread tactile allodynia, but not 1 widespread thermal hyperalgesia and trigeminal neuropathic pain following partial infraorbital nerve transection. *Pain*; 159(2): 273-283.

- Huang D, Li S, Dhaka A, Story G, Cao Y. (2012) Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molecular Pain*; 8: 66.
- Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope R. (2007) Increased macrophage activation mediated through toll like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology*; 56(7): 2192-2201.
- Hurtado-Alvarado G, Pavón L, Castillo-García S, Hernández M, Domínguez-Salazar E, Velázquez-Moctezuma J, Gómez-González B. (2013) Sleep loss as a factor to induce cellular and molecular inflammatory variations. *Clinical and Developmental Immunology*; 2013: 801341.
- Hwang S, Oh J, Valtschanoff J. (2005) Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain Research*; 1047: 261-266.
- Irwin M. (2015) Why sleep is important for health: a psychoneuroimmunology perspective. *Annual Review of Psychology*; 66: 143-172.
- Ivanov S, Dragoi A, Wang X. (2007) A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood*; 110: 1970-1981.
- Jardín I, López J, Díez R, Sánchez-Collado J, Cantonero C, Albarrán L, Woodard G, Redondo P, Salido G, Smani T, Rosado J. (2017) TRPs in pain sensation. *Frontiers in Physiology*; 9(8): 392.
- Jia G, Huang Q, Cao Y, Xie C, Shen Y, Chen J, Lu J, Zhang M, Li J, Tao Y, Cao H. (2020) Cav-1 participates in the development of diabetic neuropathy pain through the TLR4 signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*; 235(3): 2060-2070.
- Jiang W, Pisetsky D. (2006) The role of IFN-alpha and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*; 177: 3337-3343.
- Jordt S, Tominaga M, Julius D. (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97: 8134-8139.
- Joseph J, Qu L, Wang S, Kim M, Bennett D, Ro J, Caterina M, Chung M. (2019) Phosphorylation of TRPV1 S801 contributes to modality-specific hyperalgesia in mice. *The Journal of Neuroscience*; 39(50): 9954-9966.
- Julius D. (2013) TRP channels and pain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 29: 355-384.

- Jung S, Choi Y, Ko S, Park Y, Oh C, Koh S. (2001) Effects of ginsenosides on vanilloid receptor (VR1) channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Molecules and Cells*; 12: 342-346.
- Jurga A, Rojewska E, Piotrowska A, Makuch W, Pilat D, Przewlocka B, Mika J. (2016) Blockade of toll-like receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. *Neural Plasticity*; 2016: 5238730.
- Kagan J, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature Immunology*; 9(4): 361-368.
- Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, Hara T, Imai A. (2005) Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its upregulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*; 49: 977-984.
- Kang R, Chen R, Zhang Q. (2014) HMGB1 in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*; 40c: 1-116.
- Kato J, Svensson C. (2015) Role of extracellular damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) as mediators of persistent pain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; 131: 251-279.
- Kawasaki T, Kawai T. (2014) Toll like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*; 5: 461.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J, Ji R. (2008) Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *Journal of Neuroscience*; 28(20): 5189-5194.
- Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer H. (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*; 132: 818-831.
- Kelly S, Chapman V. (2002) Spinal administration of capsazepine inhibits noxious evoked responses of dorsal horn neurons in non-inflamed and carrageenan inflamed rats. *Brain Research*; 935:103-108.
- Kimball C, Luo J, Yin S, Hu H, Dhaka A. (2015) The pore loop domain of TRPV1 is required for its activation by the volatile anesthetics chloroform and isoflurane. *Molecular Pharmacology*; 88(1): 131-138.
- King S, Chambers C, Huget A, MacNevi R, McGrath P, Parker L, MacDonald A. (2011) The epidemiology of chronic pain in children and adolescents revisited: A systemic review. *Pain*; 152: 2729-2738.
- Knutson K, Van-Cauter E, Rathouz P, DeLeire T, Lauderdale D. (2010) Trends in the prevalence of short sleepers in the USA: 1975-2006. *Sleep*; 33(1): 37-45.

- Krause A, Prather A, Wager T, Lindquist M, Walker M. (2019) The pain of sleep loss: a brain characterization in humans. *The Journal of Neuroscience*; 39(12): 2291-2300.
- Kumar A, Chanana P. (2014) Sleep reduction: A link to other neurobiological diseases. *Sleep and Biological Rhythms*; 12: 150-161.
- Kundermann B, Sernal J, Huber T, Krieg J, Lautenbacher S. (2004) Sleep deprivation affects thermal pain thresholds but not somatosensory thresholds in healthy volunteers. *Psychosomatic Medicine*; 66: 32-37.
- Kuner R. (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine*; 11: 1258-1266.
- Lan L, Ping Y, Na W, Miao J, Cheng Q, Ni M, Lei L, Fang L, Guang R, Jin Z. (2010) Down-regulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model. *Molecular Pain*; 6: 1-13.
- Larson R, Carter J. (2016) Total sleep deprivation and pain perception during cold noxious stimuli in humans. *Scandinavian Journal of Pain*; 13: 12-16.
- Latremoliere, A, Ferreira A, Miracca G, Yamamoto M, Scammell T, Woolf C. (2017) Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice. *Nature Medicine*; 23(6): 768-774.
- Lau S, Procko E, Gaudet R. (2012) Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *Journal of General Physiology*; 140: 541-555.
- Lautenbacher S, Kundermann B, Krieg J. (2006) Sleep deprivation and pain perception. *Sleep Medicine Reviews*; 10: 357-369.
- Lentz M, Landis C, Rothermel J, Shaver J. (1999) Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women. *The Journal of Rheumatology*; 26(7): 1586-1592.
- Li J, Xie W, Zhang J, Baccei M. (2009) Peripheral nerve injury sensitizes neonatal dorsal horn neurons to tumor necrosis factor-alpha. *Molecular Pain*; 5:10.
- Li M, Yu Y, Yang J. (2011) Structural biology of TRP channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 704: 1-23.
- Li Y, Adamek P, Zhang H, Tatsui C, Rhines L, Mrozkova P, Li Q, Kosturakis A, Cassidy R, Harrison D, Cata J, Sapire K, Zhang H, Kennamer-Chapman R, Jawad A, Ghetti A, Yan J, Palecek J, Dougherty P. (2015a) The cancer chemotherapeutic paclitaxel increases human and rodent sensory neuron responses to TRPV1 by activation of TLR4. *Journal of Neuroscience*; 35: 13487-13500.

- Li Y, Cai J, Han Y, Xiao X, Meng XL, Su L. (2014) Enhanced function of TRPV1 via up-regulation by insulin-like growth factor-1 in a rat model of bone cancer pain. *European Journal of Pain*; 18: 774-784.
- Li Y, Zhang H, Kosturakis A, Cassidy R, Zhang H, Kennamer-Chapman R, Jawad A, Colomand C, Harrison D, Dougherty P. (2015b) MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Brain, Behavior and Immunity*; 49: 255-266.
- Lishko P, Procko E, Jin X, Phelps C, Gaudet R. (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*; 54: 905-918.
- Liu T, Gao Y, Ji R. (2012) Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neuroscience Bulletin*; 28: 131-144.
- Liu T, Xu Z, Park C, Berta T, Ji R. (2010) Toll-like receptor 7 mediates pruritus. *Nature Neuroscience*; 13: 1460-1462.
- Liu Y, Zhou L, Hu N, Xu J, Wu C, Zhang T. (2007) Tumor necrosis factor- α induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF- κ B, JNK and p38 MAPK. *Neuropharmacology*; 52(3): 708-715.
- Loggia M, Chonde D, Akeju O. (2015) Evidence for brain glial activation in chronic pain patients. *Brain*; 138: 604-615.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper C. (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*; 441: 589-594.
- Machado R, Hipólido D, Benedito-Silva A, Tufik S. (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research*; 1004: 45-51.
- Maggio M, Colizzi E, Fisichella A, Valenti G, Ceresini G, Dall'Aglio E, Ruffini L, Lauretani F, Parrino L, Ceda G. (2013) Stress hormones, sleep deprivation and cognition in older adults. *Maturitas*, 76 (1); 22-44.
- Malek N, Pajak A, Kolosowska N, Kucharczyk M, Starowicz K. (2015) The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Molecular and Cellular Neuroscience*; 65: 1-10.
- Malgorzata-Miller G, Heinbockel L, Brandenburg K, van der Meer J, Netea M, Joosten L. (2016) *Bartonella quintana* lipopolysaccharide (LPS): structure and characteristics of a potent TLR4 antagonist for in-vitro and in-vivo applications. *Science Reports*; 6: 34221.
- Marcinkiewicz C, Green M, Devine D, Duarte P, Vierck C, Yeziarski R. (2009) Social defeat stress potentiates thermal sensitivity in operant models of pain processing. *Brain Research*; 1251: 112-120.
- Marrone M, Morabito A, Giustizieri M, Chiurciu V, Leuti A, Mattioli M, Marinelli S, Riganti L, Lombardi M, Murana E, Totaro A, Piomelli D,

- Ragozzino D, Oddi S, Maccarrone M, Verderio C, Marinelli S. (2017) TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nature Communications*; 8: 15292.
- Martínez-García M, Goicoechea C, Molina-Álvarez M, Pascual D. (2020) Toll-like receptor 4: A promising crossroads in the diagnosis and treatment of several pathologies. *European Journal of Pharmacology*; 5(874): 172975.
 - Martínez-Rojas V, Barragán Iglesias P, Rocha-González H, Murbartián J, Granados-Soto V. (2014) Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hiperalgesia. *Pharmacological Reports*; 66: 964-971.
 - Matzinger P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science*; 296: 301-305.
 - McEwen B. (2006) Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. *Metabolism*; 55(2): S20-S23.
 - Meng X, Gao J, Zuo J, Wang L, Liu S, Jin X, Yao M, Namaka M. (2017) Toll like receptor 4/p38 MAPK signaling in the dorsal horn contributes to P2X3 receptor activation and BDNF over-secretion in cancer induced bone pain. *Neuroscience Research*; 125: 37-45.
 - Menkhoff I, Lötsch J. (2018) Pharmacological approaches to TRP-ion-channel-based analgesic drug development. *Drug Discovery Today*; 23(12): 2003-2012.
 - Merskey H, Bogduk N. (1994) Classification of chronic pain. En: Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, (2nd Ed.) Seattle: IASP Press.
 - Merskey H, Albe Fessard D, Bonica J, Carmon A, Dubner R, Kerr F, Lindblom U, Mumford J, Nathan P, Noordenbos W, Pagni C, Renner M, Sternbach R, Sunderland S. (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain*; 6: 249-252.
 - Mestre C, Pélissier, Fialip, Wilcox, Eschalier A. (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 32(4): 197-200.
 - Mickle A, Shepherd A, Mohapatra D. (2016) Nociceptive TRP channels: sensory detectors and transducers in multiple pain pathologies. *Pharmaceuticals*; 9: E72.
 - Mills C, Nguyen T, Tanga F, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Gomez E, Salyers A, Bannon A. (2013) Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pain*; 4: 469-479.

- Min H, Cho W, Lee H, Choi B, Kim Y, Lee H, Joo Y, Jung S, Choi S, Lee S, Lee S. (2018) Association of TRPV1 and TLR4 through the TIR domain potentiates TRPV1 activity by blocking activation-induced desensitization. *Molecular Pain*; 14: 1-10.
- Miyazaki S, Liu Ch, Hayashi Y. (2017) Sleep in vertebrate and invertebrate animals, and insights into the function and evolution of sleep. *Neuroscience Research*; 118: 3-12.
- Mohammad-Hosseini A, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. (2015) Toll-Like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*; 5: 605-614.
- Mohapatra D, Nau C. (2005) Regulation of Ca²⁺ dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*; 280: 13424-13432.
- Moiseenkova-Bell V, Stanciu L, Serysheva I, Tobe B, Wensel T. (2008) Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 105(21): 7451-7455.
- Moldofsky H, Scarisbrick P, England R, Smythe H. (1975) Musculoskeletal symptoms and non-REM sleep disturbance in patients with fibrositis syndrome and healthy subjects. *Psychosomatic Medicine*; 37: 341-351.
- Moldofsky H, Scarisbrick P. (1976) Induction of neurasthenic musculoskeletal pain syndrome by selective sleep stage deprivation. *Psychosomatic Medicine*; 38: 35-44.
- Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, Agresti A, Trisciuglio L, Musco G, Bianchi M. (2007) Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chemistry and Biology*; 14(4): 431-441.
- Moore C, Gupta R, Jordt S, Chen Y. (2018) Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neuroscience Bulletin*; 34(1): 120-142.
- Morales-Lazaro S, Simon S, Rosenbaum T. (2013) The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Journal of Physiology*; 591: 3109-3121.
- Muñoz-Castillo P. (2018) Estudio de la participación de los canales TRPV1 y anoctamina 1 en la alodinia táctil observada en ratas con restricción de sueño MOR. (Tesis de maestría) Cinvestav, Ciudad de México, México.
- Nagakura Y, Oe T, Aoki T, Matsuoka N. (2009) Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain*; 146(1-2): 26-33.
- Nakamoto K, Aizawa F, Kinoshita M, Koyama Y, Tokuyama S. (2017) Astrocyte activation in Locus Coeruleus is involved in neuropathic pain

exacerbation mediated by maternal separation and social isolation stress. *Frontiers in Pharmacology*; 8: 401.

- Nakamura Y, Morioka N, Abe H. (2013) Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1. *PLOS ONE*; 8: e73640.
- Nijs j, Loggia M, Polli A, Moens M, Huysmans E, Goudman L, Meeus M, Vanderweeën L, Ickmans K, Clauw D. (2017) Sleep disturbances and severe stress as glial activators: key targets for treating central sensitization in chronic pain patients? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*; 21(8): 817-826.
- Nishinaka T, Nakamoto K, Tokuyama S. (2015). Enhancement of nerve injury- induced thermal and mechanical hypersensitivity in adult male and female mice following early life stress. *Life Sciences*; 121: 28-34.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C and identification of two target serine residues. *Journal of Biological Chemistry*; 277(16): 13375-13378.
- O'Connor K, Hansen M, Rachal Pugh , Deak M, Biedenkapp J, Milligan E, Johnson J, Wang H, Maier S, Tracey K, Watkins L. (2003) Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. *Cytokine*; 24(6): 254-265.
- Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, Tsuboi Y, Shinoda M, Iwata K. (2013) Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. *Journal of Neuroinflammation*; 10:139.
- Olson J, Miller S. (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of Immunology*; 173: 3916-3924.
- Onen S, Alloui A, Eschalier A, Dubray C. (2000) Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat. *Neuroscience Letters*; 291: 25-28.
- Onen S, Alloui A, Gross A, Eschalier A, Dubray C. (2001a) The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *Journal of Sleep Research*; 10: 35-42.
- Onen S, Alloui A, Jourdan D, Eschalier A, Dubray C. (2001b) Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Research*; 900: 261-267.

- Orlova V, Choi E, Xie C. (2007) A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO Journal*; 26: 1129-1139.
- Otoshi K, Kikuchi S, Kato K, Sekiguchi M, Konno S. (2011) Anti-HMGB1 neutralization antibody improves pain-related behavior induced by application of autologous nucleus pulposus onto nerve roots in rats. *Spine*; 36: E692-E698.
- Park C, Lu N, Xu Z, Liu T, Serhan C, Ji R. (2011) Resolving TRPV1- and TNF-alpha-mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *Journal of Neuroscience*; 31(42): 15072-15085.
- Park B, Lee J. (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental and Molecular Medicine*; 45: e66.
- Park J, Svetkauskaite D, He Q. (2004) Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *Journal of Biological Chemistry*; 279: 7370-7377.
- Patapoutian A, Tate S, Woolf C. (2009) Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery*; 8: 55-68.
- Peri F, Calabrese V. (2014) Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *Journal of Medicinal Chemistry*; 57(9): 3612-3622.
- Pinho-Ribeiro F, Verri W Jr, Chiu I. (2017) Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends in Immunology*; 38: 5-19.
- Pluma-Pluma A. (2019) Participación del factor de necrosis tumoral α y el receptor TNFR1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por estrés crónico y por transferencia social del estrés en ratas. (Tesis de maestría) Cinvestav, Ciudad de México, México.
- Qi J, Buzas K, Fan H, Cohen J, Wang K, Mont E. (2011) Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. *Journal of Immunology*; 186(11): 6417-6426.
- Raghavendra V, Tanga F, DeLeo J (2004) Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *European Journal of Neurosciences*; 20(2): 467-473.
- Rechtschaffen A, Bergman B. (2002) Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*; 25:18-24.
- Rechtschaffen A, Bergmann B, Everso C, Kushida C, Gilliland M. (1989) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*; 12: 68-87.

- Ren K, Torres R. (2009) Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*; 60(1): 57-64.
- Ren PC, Zhang Y, Zhang X. (2012) High-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia and spinal astrocytic activation in a mouse model of type 2 diabetes. *Brain Research Bulletin*; 88: 332-337.
- Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J. (2003) IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *Journal of Immunology*; 170: 3890-3897.
- Riemann D, Nissen C, Palagini L, Otte A, Perlis M, Spiegelhalder K. (2015) The neurobiology, investigation, and treatment of chronic insomnia. *Lancet Neurology*; 14(5): 547-558.
- Roehrs T, Hyde M, Blaisdell B, Greenwald M, Roth T. (2006) Sleep loss and REM sleep loss are hyperalgesic. *Sleep*; 29: 145-151.
- Rouhiainen A, Imai S, Rauvala H, Parkkinen J. (2000) Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 84: 1087-1094.
- Roy A, Srivastava M, Saqib U, Liu D, Faisal S, Sugathan S, Bishnoi S, Baig M. (2016) Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. *International Immunopharmacology*; 40: 79-89.
- Saito O, Svensson C, Buczynski M, Wegner K, Hua X, Codeluppi S, Schaloske R, Deems R, Dennis E, Yaksh T. (2010) Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E2 and TNF. *British Journal of Pharmacology*; 160(7): 1754-1764.
- Salido G, Sage S, Rosado J. (2009) TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1793: 223-230.
- Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Haraguchi A, Aida Y, Nishimura F. (2017) Anti-CD14 antibody-treated neutrophils respond to LPS: possible involvement of CD14 upregulated by anti-CD14 antibody binding. *Immunological Investigations*; 46(2): 190-200.
- Sanz-Salvador L, Andres-Borderia A, Ferrer-Montiel A, Planells-Cases R. (2012) Agonist- and Ca²⁺ dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *Journal of Biological Chemistry*; 287: 19462-19471.
- Sardi N, Tobaldini G, Morais R, Fischer L. (2018) Nucleus accumbens mediates the pronociceptive effect of sleep deprivation: the role of adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Pain*; 159(1): 75-84.
- Sawicki C, Kim J, Weber M, Faw T, McKim D, Madalena K, Lerch J, Basso D, Humeidan M, Godbout J, Sheridan J. (2018) Microglia promote increased

- pain behavior through enhanced inflammation in the spinal cord during repeated social defeat stress. *Journal of Neuroscience*; 39(7): 1139-1149.
- Sawicki C, Kim J, Weber M, Jarrett B, Godbout J, Sheridan J, Humeidan M. (2018) Ropivacaine and bupivacaine prevent increased pain sensitivity without altering neuroimmune activation following repeated social defeat stress. *Brain, Behavior, and Immunity*; 69: 113-123.
 - Scammell T, Arrigoni E, Lipton J. (2017) Neural circuitry of wakefulness and sleep. *Neuron*; 93(4): 747-765.
 - Schaible H, Ebersberger A, Natura G. (2011) Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. *Arthritis Research and Therapy*; 13(2): 210.
 - Schoenborn C, Adams P, Peregoy J. (2013) Health behaviors of adults: United States, 2008-2010. *Vital and Health Statistics Series*; (257): 1-184.
 - Schuh-Hofer S, Wodarski R, Pfau D, Caspani O, Magerl W, Kennedy J, Treede R. (2013) One night of total sleep deprivation promotes a state of generalized hyperalgesia: A surrogate pain model to study the relationship of insomnia and pain. *Pain*; 154: 1613-1621.
 - Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. (2005) NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood*; 106: 609-616.
 - Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. (2008) HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *Journal of Immunology*; 180: 2531-2537.
 - Shapiro C, Girdwood P. (1981) Protein synthesis in rat brain during sleep. *Neuropharmacology*; 20: 457-460.
 - Shibasaki M, Sasaki M, Miura M. (2010) Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Pain*; 149: 514-521.
 - Simpson N, Scott-Sutherland J, Gautam S, Sethna N, Haack M. (2018) Chronic exposure to insufficient sleep alters processes of pain habituation and sensitization. *Pain*; 159: 33-40.
 - Sluka K, Clauw D. (2016) Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience*; 338: 114-129.
 - Smith B, Ceusters W, Goldberg L, Ohrbach R. (2011) Towards an ontology of pain and of pain-related phenomena. *Proceedings of the Conference on Ontology and Analytical Metaphysics*. Tokyo: Keio University Press; 23-36.
 - Smith M, Haythornthwaite J. (2004) How do sleep disturbance and chronic pain inter-relate? Insights from longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. *Sleep Medicine Reviews*; 8: 119-132.

- Smith Y, Stohler C, Nichols T, Bueller J, Koeppe R, Zubieta J. (2006) Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. *Journal of Neuroscience*; 26: 5777-5785.
- Smutzer G, Devassy R. (2016) Integrating TRPV1 receptor function with capsaicin psychophysics. *Advances in Pharmacological Sciences*; 2016: 1512457.
- Sorge R, LaCroix-Fralish M, Tuttle A, Sotocinal S, Austin J, Ritchie J, Chanda M, Graham A, Topham L, Beggs S, Salter M, Mogil J. (2011) Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *Journal of Neuroscience*; 31(43): 15450-15454
- Sorge R, Mapplebeck J, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander J, Martin L, Austin J, Sotocinal S, Chen D, Yang M, Shi X, Huang H, Pillon N, Bilan P, Tu Y, Klip A, Ji R, Zhang J, Salter M, Mogil J. (2015) Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*; 18(8): 1081-1083.
- Spicarova D, Palecek J. (2009) The role of the TRPV1 endogenous agonist n-oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *Journal of Neurophysiology*; 102: 234-243.
- Steeds Ch. (2016) The anatomy and physiology of pain. *Surgery*; 34(2): 55-59.
- Sun, Zeng H, Wang Q, Yu Q, Wu J, Feng Y, Deng P, Zhang H. (2018) Glycyrrhizin ameliorates inflammatory pain by inhibiting microglial activation-mediated inflammatory response via blockage of the HMGB1-TLR4-NFkB pathway. *Experimental Cell Research*; 369(1): 112-119.
- Szallasi A, Blumberg P. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*; 51: 159-212.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*; 21: 335-376.
- Takeuchi O, Akira S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*; 140: 805–820.
- Tanaka J, Seki Y, Ishikura H. (2013) Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB1-dependent hyperalgesia in rats. *British Journal of Pharmacology*; 170: 1233-1241.
- Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H. (2014) Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology*; 79: 112-118.
- Tanga F, Nutile-McMenemy N, De Leo J. (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America; 102(16): 5856-5861.

- Tekus V, Bolcskei K, Kis-Varga A, Dezsi L, Szentirmay E, Visegrady A. (2010) Effect of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor antagonist compounds SB705498, BCTC and AMG9810 in rat models of thermal hyperalgesia measured with an increasing-temperature water bath. *European Journal of Pharmacology*; 641: 135-141.
- Tomim D, Pontarolla F, Bertolini J, Arase M, Tobaldini G, Lima M, Fischer L. (2016) The pronociceptive effect of paradoxical sleep deprivation in rats: evidence for a role of descending pain modulation mechanisms. *Molecular Neurobiology*; 53(3): 1706-1717.
- Tominaga M, Caterina M, Malmberg A, Rosen A, Gilbert T, Skinner H. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain producing stimuli. *Neuron*; 21: 531-543.
- Tong W, Wang W, Huang J, Ren N, Wu S, Li Y. (2010) Spinal high-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia in a rat model of bone cancer pain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 395: 572-576.
- Ttononi G, Cirelli C. (2006) Sleep function and synaptic homeostasis; *Sleep Medicine Reviews*; 10: 49-62.
- Tracey I, Mantyh P. (2007) The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*; 55: 377-391.
- Treede R, Jensen T, Campbell J, Cruccu G, Dostrovsky J, Griffin J, Hansson P, MD, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. (2008) Neuropathic pain. Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*; 70: 1630-1636.
- Tufik S, Andersen M, Bittencourt L, Mello M. (2009) Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*; 81(3): 521-538.
- Ueda T, Yoshida M. (2010) HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1799: 114-118.
- Ukponmwan O, Ruprecht J, Dzoljic M. (1984) REM sleep deprivation decreases the antinociceptive property of enkephalinase inhibition, morphine and cold-water swim. *General pharmacology*; 15: 255-258.
- Ukponmwan O, Ruprecht J, Dzoljic M. (1986) An analgesic effect of enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 332: 376-379.

- Valtschanoff J, Rustioni A, Guo A, Hwang S. (2001) Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology*; 436: 225-235.
- van Buren J, Bhat S, Rotello R, Pauza M, Premkumar L. (2005) Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Molecular Pain*; 1:17.
- van Hulzen Z, Coenen A. (1981) Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiology and Behavior*; 27(4): 741-744.
- Vassalli A, Dijk D. (2009) Sleep functions: current questions and new approaches. *European Journal of Neuroscience*; 29: 1830-1841.
- Vaure C, Liu Y. (2014) A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*; 5: 316.
- Velázquez-Lagunas I. (2017) Participación de la alarmina HMGB1 y el receptor TLR4 en un modelo de dolor inducido por estrés crónico en ratas. (Tesis de maestría) Cinvestav, Ciudad de México, México.
- Vellani V, Kinsey A, Prandini M, Hechtfisher S, Reeh P, Magherini P, Giacomoni C, McNaughton P. (2010) Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Molecular Pain*; 6: 61.
- Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M. (2012) Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *Journal of Experimental Medicine*; 209: 1519-1528.
- Vilela F, Vieira J, Giusti-Paiva A, Silva M. (2017) Experiencing early life maternal separation increases pain sensitivity in adult offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*; 62: 8-14.
- Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Etrich R, Vyklicky L. (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *Journal of Neuroscience*; 23: 1340-1350.
- Wadachi R, Hargreaves K. (2006) Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. *Journal of Dental Research*; 85: 49-53.
- Wakatsuki K, T-Uchimura Y, Matsubara T, Nasu T, Mizumura K, Taguchi T. (2019) Peripheral nociceptive mechanisms in an experimental rat model of fibromyalgia induced by repeated cold stress. *Neuroscience Research*; S0168-0102(19): 30483-304893.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat J, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L. (1999) HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*; 285: 248-251.
- Watkins L, Maier S. (2003) Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nature Reviews Drug Discovery*; 2(12): 973-985.

- Watkins L, Martin D, Ulrich P, Tracey K, Maier S. (1997) Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain*; 71(3): 225-235.
- Weber F, Chung S, Beier K, Xu M, Luo L, Dan Y. (2015) Control of REM sleep by ventralmedulla GABAergic neurons. *Nature*; 526: 435-438.
- Wei H, Huang J, Hao B. (2011) Intrathecal administration of antioxidants attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. *Scandinavian Journal of Pain*; 2: 64-69.
- Wei H, Maa A, Wanga Y, Pertovaara A. (2008) Role of spinal 5-HT receptors in cutaneous hypersensitivity induced by REM sleep deprivation. *Pharmacological Research*; 57: 469-475.
- Weir H, Kraulis P, Hill C, Raine A, Laue E, Thomas J. (1993) Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO Journal*; 12(4): 1311-1319.
- Winston J, Shenoy M, Medley D, Naniwadekar A, Pasricha P. (2007) The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology*; 132: 615-627.
- Woo D, Jung S, Zhu M, Park C, Kim Y, Oh S. (2008) Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Molecular Pain* 2008; 4: 42.
- Woolf C. (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*; 140: 441-451.
- Woolf C. (2010) What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*; 120(11): 3742-3744.
- Wouters M, Balemans D, Van Wanrooy S, Dooley J, Cibert-Goton V, Alpizar Y, Valdez-Morales E, Nasser Y, Van Veldhoven P, Vanbrabant W, Van der Merwe S, Mols R, Ghesquière B, Cirillo C, Kortekaas I, Carmeliet P, Peetermans W, Vermeire S, Rutgeerts P, Augustijns P, Hellings P, Belmans A, Vanner S, Bulmer D, Talavera K, Vanden Berghe P, Liston A, Boeckxstaens G. (2016) Histamine receptor H1-mediated sensitization of TRPV1 mediates visceral hypersensitivity and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*; 150: 875-887.
- Wu Y, Wang Y, Wang J, Fan Q, Zhu J, Yang L, Rong W. (2019) TLR4 mediates upregulation and sensitization of TRPV1 in primary afferent neurons in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis. *Molecular Pain*; 15: 1-12.
- Wu Z, Wang S, Wu I, Mata M, Fink D. (2015) Activation of TLR-4 to produce tumour necrosis factor- α in neuropathic pain caused by paclitaxel. *European Journal of Pain*; 19: 889-898.

- Yamamoto W, Sugiura A, Nakazato-Imasato E, Kita Y. (2008) Characterization of primary sensory neurons mediating static and dynamic allodynia in rat chronic constriction injury model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 60: 717-722.
- Yang F, Cui Y, Wang K, Zheng J. (2010a) Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 107: 7083-7088.
- Yang G, Lai C, Cichon J, Ma L, Li W, Gan W. (2014) Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science*; 344: 1173-1178.
- Yang H, Hreggvidsdottir H, Palmblad K. (2010b) A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 107: 11942-11947.
- Yang H, Lundback P, Ottosson L. (2012) Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Molecular Medicine*; 18: 250-259.
- Yao J, Qin F. (2009) Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor. *PLOS Biology*; 7: e46.
- Zhang X, Huang J, McNaughton P. (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO Journal*; 24: 4211-4223.
- Zhao R, Tsang S. (2017) Versatile roles of intracellularly located TRPV1 channel. *Journal of Cellular Physiology*; 232(8): 1957-1965.
- Zhao Z, Zhao X, Veasey S. (2017) Neural consequences of chronic short sleep: reversible or lasting? *Frontiers in Neurology*; 8: 235.
- Zhou J, Zhang L, Wei H. (2013) Neuropeptide Y induces secretion of highmobility group box 1 protein in mouse macrophage via PKC/ERK dependent pathway. *Journal of Neuroimmunology*; 260: 55-59.
- Zhou L, Yang T, Wei X, Liu Y, Xin W, Chen Y. (2011) Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat. *Brain, Behavior and Immunity*; 25(2): 322-334.
- Zhou L, Zhong Y, Ren W, Li Y, Zhang T, Liu X. (2008) BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Experimental Neurology*; 212(2): 507-514.
- Zimmerman M.1983. Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain*: 109-110