



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

Departamento de Farmacobiología

**PARTICIPACIÓN DEL CO-TRANSPORTADOR KCC2 EN UN MODELO DE
DOLOR INDUCIDO POR ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS**

Tesis que presenta

Q.F.B. Erika Curiel Gómez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de Tesis:

Dr. Vinicio Granados Soto

Ciudad de México

Agosto, 2018

La parte experimental del presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Dolor (Laboratorio 12) del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 615620 y del proyecto CB-2012/179294, ambos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vinicio Granados Soto por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación y por las enseñanzas que contribuyeron en mi desarrollo académico.

Al Dr. José Alonso Fernández Guasti y a la Dra. Gabriela Castañeda Corral, por su tiempo y sus aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A Carolina por brindarme su amistad, compañía y apoyo incondicional.

A Elena por su amistad y consejos que ayudaron en mi desarrollo personal.

A Jesús, Angélica, Cristina, Deysi y Ernesto por su apoyo, enseñanzas, risas, consejos y momentos tan divertidos.

A mis compañeros de laboratorio: Yarim, Isabel, Iker, Alejandro, Úrzula y Erick por apoyarme cuando lo necesité y por hacer ameno el tiempo compartido.

A la M. en C. Ana Belen Salinas Abarca y a la M. en C. Guadalupe C. Vidal Cantú por su apoyo en el desarrollo experimental.

A la M.B.E.I. María del Pilar Quinteros Carrillo por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

A todo el personal de bioterio, vigilancia, intendencia y administrativo que labora en el Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, Unidad Coapa.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a las personas más importantes de mi vida, mi familia. Gracias a mis papás y hermanos he llegado hasta donde estoy. Gracias a su apoyo, amor y consejos he podido lograr cada una de mis metas. Los amo.

ÍNDICE

	ÍNDICE DE FIGURAS	v
	ÍNDICE DE TABLAS	vi
	RESUMEN.....	vii
	ABSTRACT	viii
1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Dolor	1
1.2	Clasificación del dolor	1
1.3	Nociceptores	3
1.4	Transmisión nociceptiva.....	4
1.5	Mecanismos moleculares del dolor.....	6
1.5.1	Sensibilización periférica	6
1.5.2	Sensibilización central.....	7
1.5.3	Activación de la microglía.....	8
1.5.4	Desinhibición	10
1.6	Co-transportador KCC2	12
1.6.1	KCC2 y su interacción con BDNF	14
1.7	<i>Priming</i>	16
1.8	Estrés.....	17
1.8.1	Sistema nervioso autónomo	18
1.8.2	Eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal	18
2	ANTECEDENTES	20
2.1	Estrés y dolor	20
2.2	Modelos de hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés en animales	23

ÍNDICE

2.3	KCC2 y dolor.....	26
2.4	KCC2 y estrés.....	29
3	JUSTIFICACIÓN.....	32
4	HIPÓTESIS.....	33
5	OBJETIVO.....	33
5.1	Objetivo general.....	33
5.2	Objetivos particulares.....	33
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
6.1	Animales.....	34
6.2	Fármacos.....	34
6.1	Modelo de hipersensibilidad inducida mediante estrés crónico por restricción de movimiento.....	34
6.2	Evaluación de las conductas nociceptivas.....	35
6.2.1	Evaluación de la alodinia táctil.....	35
6.2.2	Evaluación de la hiperalgesia térmica.....	35
6.3	Extracción de tejido.....	36
6.4	Determinación de la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado.....	36
6.4.1	<i>Western Blot</i>	36
6.5	Cuantificación de las concentraciones tisulares de BDNF.....	37
6.5.1	ELISA.....	37
7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
8	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
8.1	Desarrollo del modelo de dolor inducido por estrés crónico.....	39
8.2	<i>Priming</i> inducido por estrés crónico.....	39
8.3	Diseño farmacológico.....	40

8.4	Estudio molecular.....	41
8.4.1	Cuantificación de BDNF	41
8.4.2	Determinación de la expresión del co-transportador KCC2 total y KCC2 fosforilado por <i>western blot</i>	42
9	RESULTADOS	43
9.1	El estrés crónico produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica en ratas .	43
9.2	El estrés crónico produjo <i>priming</i>	45
9.3	Estudio farmacológico.....	46
9.3.1	La administración intratecal de DIOA y VU0463271 produjo alodinia táctil en ratas <i>naïve</i>	46
9.3.2	La administración de CLP 257 redujo la alodinia en ratas con estrés crónico	48
9.3.3	La administración subcrónica de minociclina redujo la alodinia en ratas con estrés crónico.....	49
9.4	Estudio molecular.....	50
9.4.1	El estrés crónico aumentó las concentraciones de BDNF en la médula espinal.....	50
9.4.2	El estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la médula espinal	51
10	DISCUSIÓN.....	53
10.1	El estrés crónico produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica	53
10.2	El estrés crónico produjo <i>priming</i>	54
10.3	La administración intratecal de DIOA y VU0463271 produjo alodinia táctil en ratas <i>naïve</i>	56
10.4	La administración de CLP 257 redujo la alodinia en ratas con estrés crónico	57
10.5	La administración subcrónica de minociclina redujo la alodinia en ratas con estrés crónico.....	58

ÍNDICE

10.6	El estrés crónico aumentó las concentraciones de BDNF en la médula espinal	59
10.7	El estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la médula espinal	61
11	CONCLUSIONES	63
11.1	Conclusiones particulares	63
11.2	Conclusión general	63
12	PERSPECTIVAS	64
13	REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DEL DOLOR. 2

FIGURA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS NOCICEPTORES..... 4

FIGURA 3. SENSIBILIZACIÓN PERIFÉRICA..... 7

FIGURA 4. ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA. 9

FIGURA 5. DESINHIBICIÓN PRE Y POSTSINÁPTICA 12

FIGURA 6. ESTRUCTURA DE KCC2 13

FIGURA 7. MICROGLÍA-BDNF-TRKB-KCC2 15

FIGURA 8. ESTRÉS Y DOLOR 22

FIGURA 9. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EVALUACIÓN CONDUCTUAL DEL DESARROLLO DE HIPERSENSIBILIDAD NOCICEPTIVA INDUCIDO POR ESTRÉS CRÓNICO. 39

FIGURA 10. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EVALUACIÓN CONDUCTUAL DEL EFECTO DEL *PRIMING* EN LA HIPERSENSIBILIDAD NOCICEPTIVA INDUCIDO POR ESTRÉS CRÓNICO. 40

FIGURA 11. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ALODÍNICO DE LOS INHIBIDORES DE KCC2 EN RATAS *NAÏVE*. 40

FIGURA 12. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIALODÍNICO DE CLP 257 EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD AL DOLOR INDUCIDA POR ESTRÉS CRÓNICO..... 41

FIGURA 13. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO I.T. DE MINOCICLINA EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDA POR ESTRÉS CRÓNICO. 41

FIGURA 14. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EXTRACCIÓN DE MÉDULA ESPINAL PARA EL ELISA. LOS DÍAS MARCADOS REPRESENTAN LOS TIEMPOS EN QUE SE OBTUVO LA MÉDULA ESPINAL (ME). 42

FIGURA 15. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EXTRACCIÓN DE MÉDULA ESPINAL Y GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL PARA EL *WESTERN BLOT*. 42

FIGURA 16. EL ESTRÉS CRÓNICO PRODUJO ALODINIA TÁCTIL E HIPERALGESIA TÉRMICA . 44

FIGURA 17. EL ESTRÉS CRÓNICO PRODUJO *PRIMING*..... 45

INDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS

FIGURA 18. EL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DEL CO-TRANSPORTADOR KCC2 PRODUJO ALODINIA TÁCTIL EN RATAS INTACTAS.....	47
FIGURA 19. EFECTO ANTIALODÍNICO DEL CLP 257 EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDA POR ESTRÉS CRÓNICO	48
FIGURA 20. EFECTO ANTIALODÍNICO DE MINOCICLINA EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDA POR ESTRÉS CRÓNICO	49
FIGURA 21. EL ESTRÉS CRÓNICO AUMENTÓ LAS CONCENTRACIONES TISULARES DE BDNF.	50
FIGURA 22. EL ESTRÉS CRÓNICO DISMINUYÓ LA EXPRESIÓN DE KCC2 TOTAL EN LA MÉDULA ESPINAL.....	52
FIGURA 23. EL ESTRÉS CRÓNICO DISMINUYÓ LA EXPRESIÓN DE KCC2 FOSFORILADO EN LA MÉDULA ESPINAL.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. EL ESTRÉS CRÓNICO POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO PRODUCE HIPERSENSIBILIDAD NOCICEPTIVA.	25
TABLA 2. EL DOLOR CRÓNICO REDUCE LA EXPRESIÓN DE KCC2 ESPINAL EN LA RATA Y RATÓN.	27
TABLA 3. EL ESTRÉS DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE KCC2 EN EL PVN DEL HIPOTÁLAMO, HIPOCAMPO Y MÉDULA ESPINAL.....	30

RESUMEN

La exposición a estrés crónico produce hipersensibilidad y exacerba la hipersensibilidad de diversos síndromes de dolor funcional. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el estrés induce hipersensibilidad no son bien conocidos. Estudios previos han reportado que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) liberado de la microglía disminuye la expresión del co-transportador K^+-Cl^- 2 (KCC2) en modelos de dolor neuropático e inflamatorio. Sin embargo, el papel de KCC2 en el dolor funcional se desconoce. El propósito de esta investigación fue estudiar la participación de KCC2 en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés crónico en ratas Wistar hembras. El estrés crónico por restricción de movimiento (2 h al día durante 28 días) produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica en ambas patas traseras desde el día 21 al 28. Además, la reexposición a 5 días de estrés produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica treinta días después de suspender el estrés. La inyección intratecal de los inhibidores de KCC2, DIOA (0.02-20 μ g) o VU0463271 (0.02-20 μ g), pero no del vehículo, produjo alodinia táctil de manera dependiente de la dosis en ratas *naïve*. La inyección intratecal del activador de KCC2, CLP 257 (100-300 μ g), pero no del vehículo, redujo de forma dependiente de la dosis la alodinia táctil inducida por el estrés crónico. También, el tratamiento espinal (a partir del día 23 de estrés) con minociclina (100 μ g/día) durante 5 días redujo la alodinia táctil. El estrés crónico aumentó los niveles tisulares de BDNF en la porción dorsal de la médula espinal en el día 21 y 28, disminuyó la expresión de la proteína KCC2 total y KCC2 fosforilado en la porción dorsal de la médula espinal desde el día 7 hasta el 28. La expresión de KCC2 se restauró cuando los animales se recuperaron de la hipersensibilidad y disminuyó tras reexponer a cinco días de estrés. Los resultados sugieren que el estrés crónico induce hipersensibilidad nociceptiva debido a que el BDNF disminuye la expresión del co-transportador KCC2 en la médula espinal.

ABSTRACT

Exposure to chronic stress produces hypersensitivity and exacerbates the hypersensitivity of various syndromes of functional pain. However, the mechanisms by which stress induces hypersensitivity are not well known. Previous studies have reported that microglia-derived brain-derived neurotrophic factor (BDNF) leads to the reduction of K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 (KCC2) expression in neuropathic and inflammatory pain models. However, the role of KCC2 in functional pain is unknown. The aim of this research was to study the participation of spinal KCC2 in the nociceptive hypersensitivity induced by chronic restraint stress in female Wistar rats. Chronic restraint stress (2 h daily for 28 days) produced tactile allodynia and thermal hyperalgesia in both hind paws from day 21 to 28. Furthermore, the reexposure to 5 days of stress produced tactile allodynia and thermal hyperalgesia after the stress had suspended for thirty days. Intrathecal injection of the KCC2 inhibitors DIOA (0.02-20 µg) or VU0463271 (0.02-20 µg), but not vehicle, produced tactile allodynia in a dose-dependent manner in *naïve* rats. Intrathecal injection of the KCC2 activator CLP 257 (100-300 µg), but not vehicle, reduced in a dose-dependent manner chronic stress-induced tactile allodynia. Moreover, spinal treatment (on day 23 after stress) with minocycline (100 µg/day) for 5 days reduced tactile allodynia. Chronic stress enhanced BDNF tissue levels in the dorsal portion of the spinal cord from day 21 and 28 and decreased total KCC2 and phosphorylated KCC2 protein expression in the dorsal portion of the spinal cord from day 7 to 28. Also, expression of KCC2 was restored when the animals recovered from hypersensitivity and KCC2 decreased after re-exposure to five days of stress. Results suggest that chronic restraint stress induces nociceptive hypersensitivity by increasing BDNF, which then leads to down-regulation of KCC2 expression at the spinal cord.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Dolor

El dolor es un mecanismo de alarma que se activa en respuesta a un daño inminente para el organismo (Scholz y Woolf, 2002). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial en un tejido, o descrita en términos de dicho daño” (Loeser y Treede, 2008).

1.2 Clasificación del dolor

Existen diversos criterios para clasificar al dolor. Por ejemplo, con base en su duración se divide en agudo y crónico, mientras que de acuerdo con el mecanismo neurofisiológico que lo origina se clasifica en nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional (**Figura 1**) (Woolf, 2004; Scholz y Woolf, 2002). Tanto el dolor nociceptivo como el inflamatorio desempeñan un papel de alarma que alertan al individuo sobre la presencia de estímulos potencialmente dañinos, permitiendo reaccionar adecuadamente ante el estímulo y minimizar el daño. Sin embargo, tanto el dolor neuropático y funcional son patológicos y no ofrecen ningún beneficio (Costigan y Woolf, 2000).

A continuación se describe brevemente cada uno de estos:

- **Dolor nociceptivo:** Es el dolor que se genera por la activación de nociceptores en ausencia de daño tisular visible. Se considera como un sistema de alerta ante estímulos potencialmente dañinos.
- **Dolor inflamatorio:** Es el dolor generado por inflamación o daño al tejido. Las células residentes del tejido dañado y del sistema inmune liberan mediadores como citocinas, factores de crecimiento, aminas (histamina, serotonina), prostaglandinas y protones, entre otros. Estos mediadores activan directamente a los nociceptores evocando dolor. Otros sensibilizan al

INTRODUCCIÓN

sistema nervioso somatosensorial para permitir la activación de las vías nociceptivas.

- **Dolor neuropático:** Es el dolor que resulta de una lesión o enfermedad que se produce en el tejido nervioso a nivel periférico y/o central que afecta al sistema somatosensorial.
- **Dolor funcional:** Es el dolor que se origina en ausencia de inflamación aparente o daño al tejido o los nervios. Se cree que el aumento de la sensibilidad y la percepción del dolor ocurren en respuesta a un procesamiento anormal en el sistema nervioso central (SNC) (Woolf, 2004; Scholz y Woolf, 2002).

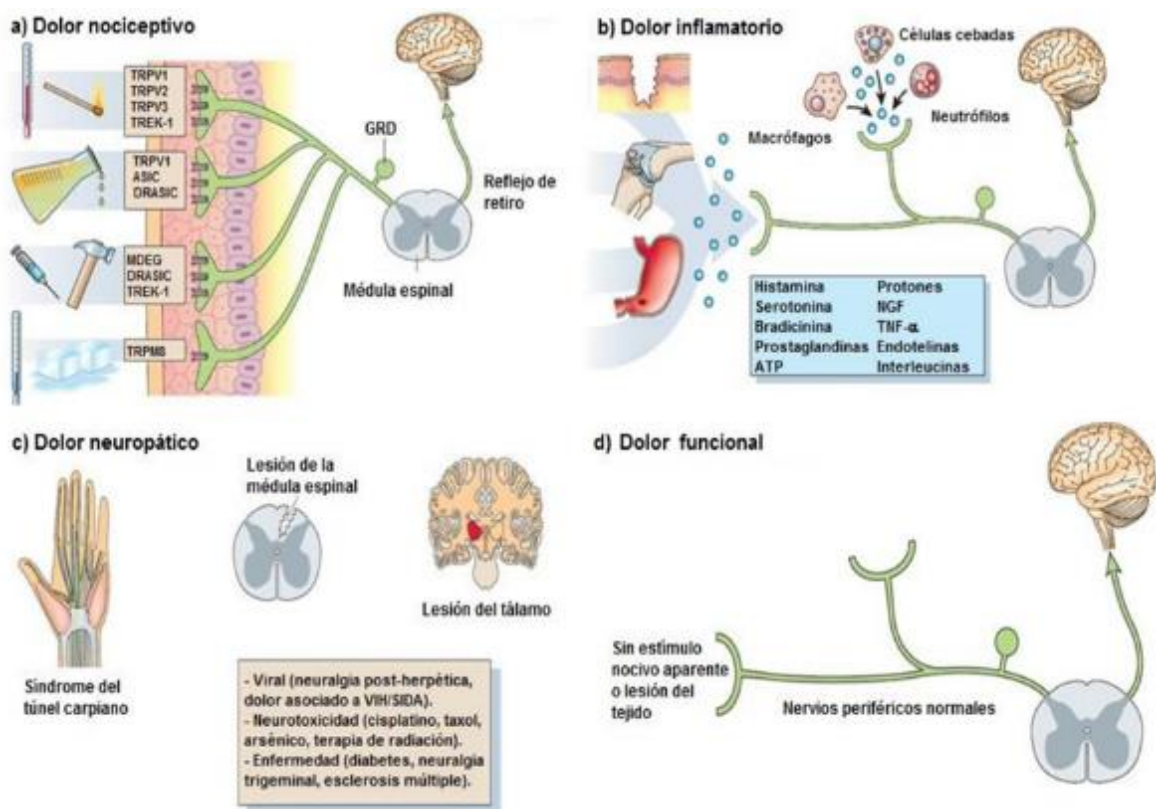


Figura 1. Clasificación del dolor. Con base en el mecanismo neurofisiológico que lo origina, el dolor se clasifica en **a)** nociceptivo, **b)** inflamatorio, **c)** neuropático y **d)** funcional. Modificado de Scholz y Woolf, 2002.

1.3 Nociceptores

La nocicepción se refiere a los procesos mediante el cual los organismos detectan estímulos nocivos (térmicos, mecánicos o químicos). Estos estímulos se detectan a través de una subpoblación de neuronas periféricas denominadas nociceptores (neuronas sensoriales que son capaces de transducir y codificar estímulos nocivos) (Basbaum y Jessell, 2000). Los nociceptores tienen sus cuerpos celulares en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) o ganglio trigémino (GT). Estas son neuronas pseudounipolares cuyo axón bifurca en una terminal periférica, que inerva al órgano blanco, y en una terminal central, que hace sinapsis con neuronas de segundo orden en la médula espinal (Basbaum *et al.*, 2009). Los nociceptores se clasifican de acuerdo con su velocidad de conducción, diámetro de sus axones y grado de mielinización en **(Figura 2)** (Julius y Basbaum, 2001).

- **Las fibras A β :** son mielinizadas, de diámetro grande (más de 10 μm) y conducen potenciales de acción a una velocidad de 30 a 100 m/seg. Además, estas fibras tienen un umbral de activación bajo, es decir, se activan con estímulos propioceptivos.
- **Las fibras A δ** son ligeramente mielinizadas, de diámetro intermedio (2-6 μm), con una velocidad de conducción de 12-30 m/seg. Las fibras A δ se subdividen en 2 clases:
 - Fibras A δ tipo I: responden a estímulos químicos y mecánicos, pero tienen un umbral de activación elevado frente a estímulos térmicos (>52 °C).
 - Fibras A δ tipo II: responden preferentemente a estímulos térmicos (40-45 °C), pero su umbral de activación es elevado frente a estímulos mecánicos.
- **Las fibras C** son amielínicas, de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm) y conducen a una velocidad de 2 m/seg. Su umbral de activación es alto, es decir, responden ante estímulos nocivos mecánicos, térmicos y químicos. Estas

INTRODUCCIÓN

las fibras se subclasifican a su vez en peptidérgicas y no peptidérgicas. Las fibras peptidérgicas expresan y liberan neuropéptidos como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), así como a la cinasa A del receptor de tropomiosina (TrkA). Por su parte, las neuronas no peptidérgicas se identifican porque poseen un sitio de unión para isolectina B4 (IB4), expresan al receptor purinérgico P2X₃ y al receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Julius y Basbaum, 2001; Merighi *et al.*, 2008).

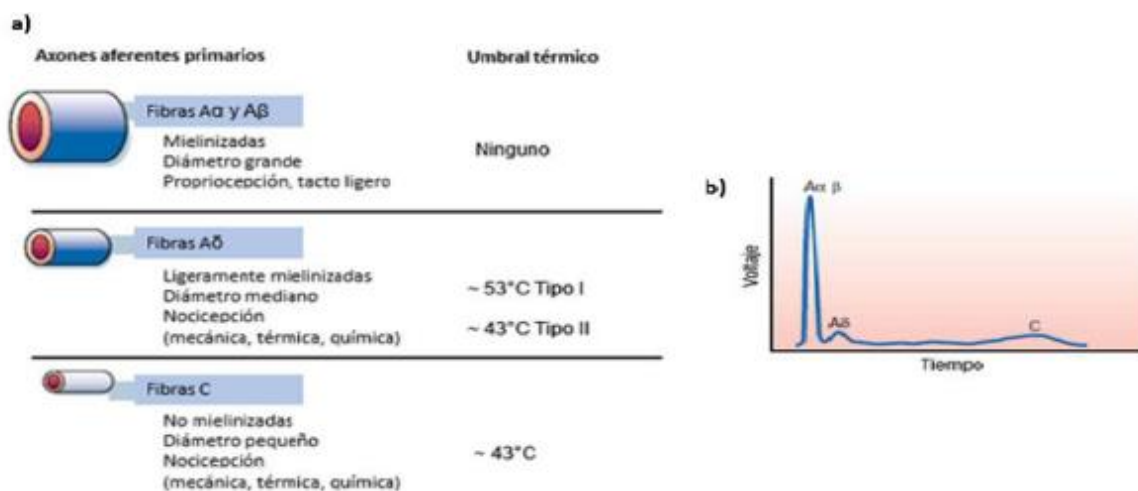


Figura 2. Clasificación de los nociceptores. **a)** Nervios periféricos que incluyen fibras de diámetro grande (A α y A β), diámetro medio (A δ) y fibras de diámetro pequeño (C). **b)** Registro de un potencial de acción de un nervio periférico que refleja la relación directa entre la velocidad de conducción y el diámetro de la fibra. Modificado de Julius y Basbaum, 2001.

1.4 Transmisión nociceptiva

El proceso que conduce a la percepción del dolor comienza con la activación de los nociceptores por estímulos nocivos que se traducen a potenciales de acción (Julius y Basbaum, 2001). Los potenciales de acción se propagan a través de las fibras aferentes primarias hasta las terminales centrales del nociceptor, localizadas en el asta dorsal de la médula espinal (Woolf, 2004). La llegada del potencial de acción a la terminal central provoca la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, permitiendo la entrada del Ca²⁺. El aumento del Ca²⁺ intracelular induce la liberación

de diversos mediadores en el espacio sináptico como glutamato, trifosfato de adenosina (ATP), aspartato y SP. Estos mediadores activan a sus respectivos receptores (AMPA, NMDA, mGlu, NK1, P2X, P2Y) localizados en células de la glía espinal (astrocitos y microglía) y neuronas presináptica (primer orden) y postsináptica (segundo orden), esto favorece la amplificación de la transmisión del dolor (McMahon *et al*, 2013). Posteriormente, la información nociceptiva asciende al tálamo a través de neuronas de segundo orden por la vía espinotalámica y la vía espinoparabraquial principalmente (Julius y Basbaum, 2001; Woolf 2004). Las neuronas de tercer orden localizadas en el tálamo, proyectan hacia la corteza somatosensorial, responsable de modular la percepción y detección del estímulo nocivo *per se* y hacia áreas del sistema límbico, involucradas en la modulación del componente aversivo-emocional del dolor (Ossipov *et al.*, 2010, 2014; Merighi *et al.*, 2008).

Por otro lado, los centros supraespinales influyen en el procesamiento de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal, a través de un circuito descendente con proyecciones serotoninérgicas y noradrenérgicas (Ossipov *et al.*, 2010, 2014). Los impulsos generados en la amígdala, tálamo, hipotálamo, y corteza anterior del cíngulo se integran en la sustancia gris periacueductal (PAG), que posteriormente activan a neuronas serotoninérgicas en la médula rostroventral (RVM) o neuronas noradrenérgicas en la formación reticular. Las neuronas de la RVM envían proyecciones a lo largo del funículo dorsolateral hacia la médula espinal y liberan serotonina y noradrenalina. Estas sustancias actúan directa o indirectamente a través de interneuronas inhibitoras para inhibir la liberación de transmisores nocivos de fibras aferentes primarias o para inhibir la activación de neuronas de segundo orden y de esta manera modulan la conducción de la información nociceptiva (Ossipov *et al.*, 2010, 2014; Kyranou y Puntillo, 2012).

1.5 Mecanismos moleculares del dolor

Se han identificado múltiples mecanismos involucrados en la generación de dolor. Los más estudiados son la sensibilización periférica, sensibilización central, activación de la microglía/astrocitos y desinhibición (Woolf, 2004).

1.5.1 Sensibilización periférica

La sensibilización periférica se refiere al aumento de la capacidad de respuesta y reducción del umbral de activación de los nociceptores para la estimulación de sus campos receptivos (Loeser y Treede, 2008). El daño al nervio y la inflamación del tejido alteran el ambiente químico de la terminal periférica del nociceptor. Las células dañadas liberan diversos mediadores como prostaglandinas, 5-HT, histamina, bradicinina, protones (H^+), ATP, óxido nítrico, interleucinas (IL), quimiocinas, radicales libres, endotelinas, leucotrienos, SP y CGRP, entre otros. Estos mediadores actúan sobre sus respectivos receptores ubicados en las terminales de las aferentes primarias. La activación de esta gran variedad de receptores lleva a la activación de vías de señalización que involucran principalmente la activación de proteínas cinasas y aumento de la transcripción de genes. Como consecuencia se altera la expresión, distribución y fosforilación de canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9), canales de calcio (Cav2.2 y Cav3.2-3.1), receptores de potencial transitorio (TRP) y canales de potasio (Kv1-Kv4, TREK1), principalmente. Esto aumenta las corrientes de sodio y calcio en la terminal periférica, lo que conduce a un aumento de la excitabilidad membranal, de manera que un estímulo despolarizante produce más potenciales de acción de los que normalmente se producen en la terminal nociceptiva. A su vez las fibras aferentes primarias liberan SP y CGRP lo que produce vasodilatación y favorece la extravasación de células del sistema inmunológico. Estas células liberan más mediadores proinflamatorios que estimulan aún más al nociceptor formando así un círculo “vicioso” que conlleva a la

sensibilización persistente y por lo tanto a la percepción del dolor (**Figura 3**) (Woolf, 2004; Fong y Schug, 2014).

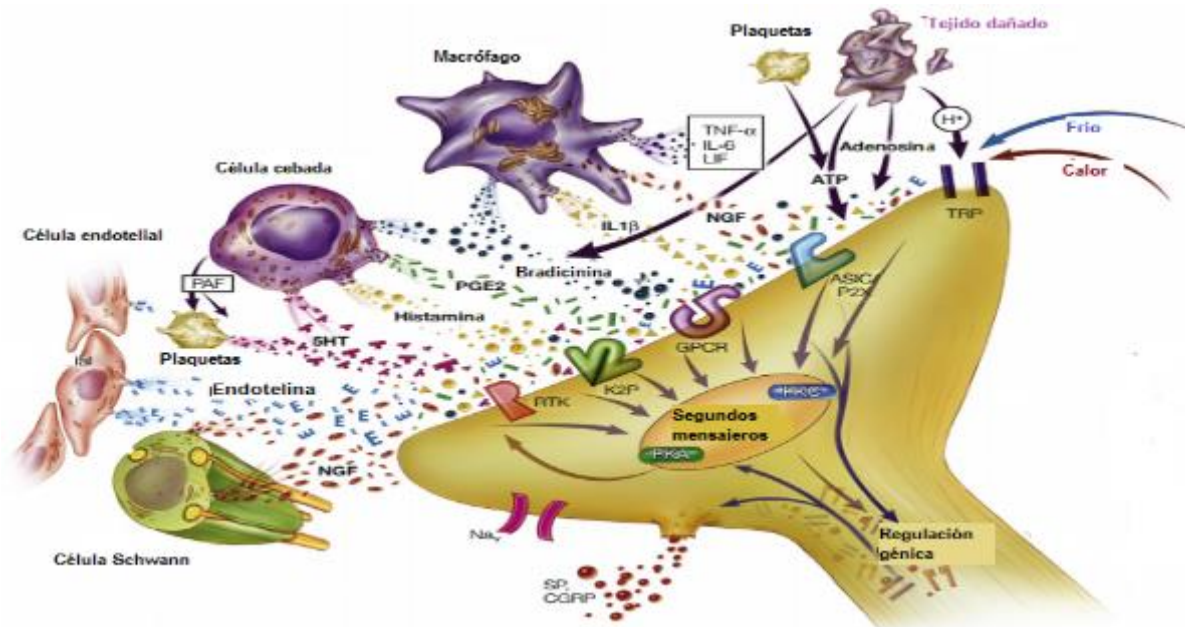


Figura 3. Sensibilización periférica. Células neuronales y no neuronales liberan numerosas sustancias químicas a las terminales periféricas de los nociceptores. Los mediadores liberados incluyen protones (H^+), trifosfato de adenosina (ATP), factor de crecimiento neural (NGF), citocinas como factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) e interleucinas ($IL-1\beta$, $IL-6$), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y factor activador de plaquetas (FAP), entre otros. La unión de los ligandos a sus receptores activa vías de señalización que involucra principalmente la activación de proteínas cinasas y aumento de la transcripción de genes. Esto aumenta la capacidad de respuesta y reduce del umbral de activación de los nociceptores. Modificado de McMahon *et al.*, 2013.

1.5.2 Sensibilización central

La sensibilización central es un proceso de amplificación de la transmisión nociceptiva entre la terminal central de las neuronas sensoriales y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Los mecanismos que contribuyen al establecimiento de la sensibilización central comienzan con la liberación de mediadores de las terminales centrales de las fibras aferentes primarias que actúan en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Woolf, 2004; Basbaum *et al.*, 2009). Algunos ejemplos de estos neurotransmisores liberados de las aferentes primarias son el glutamato, la SP, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), ATP, CGRP y quimiocinas. El glutamato activa al receptor AMPA, lo que

permite la apertura del canal y la entrada de Na^+ a la neurona postsináptica resultando en su despolarización. Esta despolarización remueve el ion Mg^{2+} que bloquea al canal del receptor NMDA, favoreciendo su activación por glutamato. La activación de los receptores AMPA y NMDA junto con la activación de receptores metabotrópicos y con actividad de tirosina cinasa permiten la entrada de Ca^{2+} a la neurona (Woolf, 2004; Basbaum *et al.*, 2009). El incremento intracelular de Ca^{2+} estimula la síntesis y activación de diversas cinasas, que a su vez fosforilan receptores de membrana y canales iónicos. La fosforilación de estas proteínas incrementan la excitabilidad neuronal. Por otro lado, los mediadores (ATP, CCL-21, CCL-2, CX3CL-1) liberados de la terminal central de las fibras aferentes primarias activan a la microglía y astrocitos espinales, lo que promueve la secreción de citocinas y factores de crecimiento (IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, NGF, BDNF) que activan a sus receptores sobre las terminales post-sinápticas y favorecen la hiperexcitabilidad neuronal (Sharif-Naeini y Basbaum, 2011; Guan *et al.*, 2016). La estimulación persistente de las neuronas sensoriales provoca cambios transcripcionales que modifican el fenotipo neuronal (alteración de la expresión de proteínas), manteniendo así la excitación neuronal y facilitando la transmisión nociceptiva (Julious y Basbaum, 2001). Todos estos mecanismos incrementan la excitabilidad neuronal y sustentan el establecimiento de la sensibilización central (Costigan y Woolf, 2000; Woolf y Ma, 2007).

1.5.3 Activación de la microglía

La microglía tiene un papel importante en el sistema inmune del SNC. Sin embargo, se ha sugerido que la microglía activada participa en el mantenimiento del dolor (Beggs *et al.*, 2012). Después de daño al tejido o inflamación, los factores liberados de la terminal central de las neuronas aferentes primarias como el ATP, CSF-1 (factor estimulante de colonias 1), quimiocinas (como CCL-21 y CCL-2) y CX3CL-1 (también conocida como fractalcina), entre otros, activan a la microglía (Milligan y Watkins, 2009; Beggs *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2016). La activación de estas células gliales se caracteriza por la hipertrofia de su cuerpo celular, aumento de marcadores

como CD11b y la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado-1 (Iba1), activación de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y liberación de citocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno, entre otros (BDNF, NGF, TNF- α , IL-1 e IL-6). Los mediadores liberados de la microglía se unen a receptores localizados en las neuronas de primer y segundo orden y favorecen la sensibilización central (Julius y Basbaum, 2001; Solorzano, *et al.*, 2015; Tsuda, 2016). Otros neuromoduladores incluyen productos de la COX, ON, ATP, D-serina y glutamato, los cuales favorecen la entrada de Ca²⁺ en las neuronas de la médula espinal y estimulan la fosforilación de receptores y canales, incrementando su actividad (Ji *et al.*, 2013). También, la microglía activada se caracteriza porque aumenta la expresión del receptor P2X₄. La activación de este receptor permite la entrada de Ca²⁺ y activa a la cinasa p-38 MAPK lo que promueve la síntesis y liberación de BDNF (**Figura 4**) (Beggs y Salter, 2010, 2013).

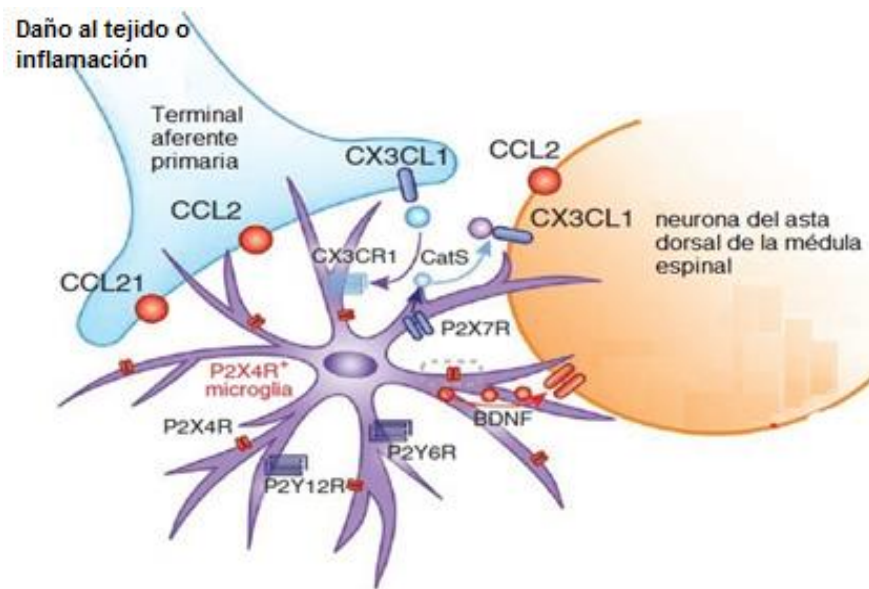


Figura 4. Activación de la microglía. El daño al tejido o la inflamación estimulan a las fibras aferentes primarias para liberar mediadores que activan a la microglía espinal. La microglía activada adopta un fenotipo que se caracteriza por el aumento en la expresión de diversas proteínas y por que libera múltiples neuromoduladores. Los mediadores liberados por la microglía activada se unen a receptores localizados en las neuronas de segundo orden y favorecen la sensibilización central. Ligando de quimiocina 2 (CCL2), ligando de quimiocina 1 (CX3CL1), receptor purinérgico P2X7 (P2X7R), receptor purinérgico P2Y12 (P2Y12R), receptor purinérgico P2Y6 (P2Y6R), catepsina S (CatS), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Modificado de Beggs *et al.*, 2012.

1.5.4 Desinhibición

La desinhibición es el proceso que implica la pérdida de los mecanismos inhibidores en el procesamiento de la información nociceptiva, facilitando la transmisión la información hacia centros superiores (Price *et al.*, 2005). Los sistemas inhibidores en el procesamiento de la información nociceptiva están mediados por interneuronas que utilizan ácido γ -aminobutírico (GABA) o glicina como neurotransmisores y representan alrededor del 40% de las neuronas localizadas en el asta dorsal de la médula espinal (Bardoni *et al.*, 2013). Tanto GABA como glicina actúan en sus respectivos receptores localizados en las neuronas de segundo orden, mientras que GABA además actúa en receptores presinápticos localizados en las terminales centrales de las aferentes primarias (Price y Prescott, 2015). La activación del receptor GABA_A deprime la excitabilidad neuronal debido a que hiperpolariza la membrana postsináptica y/o produce un corto circuito debido a la despolarización de la membrana presináptica, impidiendo la liberación de mediadores excitadores (Bardoni *et al.*, 2013; Prescott, 2015).

Los receptores GABA_A son canales iónicos dependientes de ligando que permean Cl⁻ e inhiben la actividad neuronal. El grado de inhibición depende de los niveles intracelulares del Cl⁻. Los niveles del ion cloruro en las neuronas esta regulado por diversas proteínas, por ejemplo, el co-transportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 1 (NKCC1) que se expresa en las fibras aferentes primarias (Price *et al.*, 2005). El NKCC1 transporta Na⁺, K⁺ y Cl⁻ al interior de las neuronas sensoriales primarias lo que mantiene los niveles intracelular de Cl⁻ alta (**Figura 5 C**). Por tal motivo, cuando el GABA activa a su receptor GABA_A permite la salida de Cl⁻ y produce una despolarización, conocida como la despolarización de la neurona aferente primaria (PAD). Esta despolarización reduce la transmisión nociceptiva debido a que modifica la magnitud del potencial de acción entrante y en consecuencia disminuye la liberación de mediadores excitadores en la terminal periférica y central del nociceptor (Vinay *et al.*, 2008; Álvarez-Leefmans, 2009).

Esta reportado que el daño al tejido nervioso o la inflamación persistente aumenta la expresión y/o la actividad del NKCC1, por lo tanto, los niveles intracelulares del Cl⁻ incrementan aún más (**Figura 5 D**). En estas condiciones, la activación del receptor GABA_A desencadena una salida masiva de Cl⁻. Esto genera una PAD excesiva alcanzando umbrales de disparo de potenciales de acción en la aferente primaria y originando lo que se conoce como reflejos de la raíz dorsal (RRD). Los RRD inducen la liberación de diversos mediadores a la terminal periférica y central de las aferentes primarias lo que contribuye a la sensibilización (Cervero *et al.*, 2003; Galan y Cervero 2005; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013).

Por su parte, las neuronas de proyección de la medula espinal expresan al co-transportador K-Cl⁻ 2 (KCC2). El KCC2 mantiene los niveles intracelulares de Cl⁻ bajos debido a que transporta Cl⁻ y K⁺ al espacio extracelular (**Figura 5 A**) (Price y Prescott, 2015; Hammond y Drower, 1984). La activación del receptor GABA_A permite la entrada de iones Cl⁻ a la neurona de segundo orden, lo que resulta en hiperpolarización (inhibición de la excitabilidad). Sin embargo, en condiciones de dolor la expresión de KCC2 disminuye y el Cl⁻ intracelular se acumula (**Figura 5 B**) (Kahle *et al.*, 2008; Price y Prescott, 2015). Esto provoca un cambio despolarizante del potencial de equilibrio del Cl⁻ lo que reduce la capacidad de inhibición de los receptores GABA_A (desinhibición) e incluso puede producir excitación (Price y Geranton, 2009; Julius y Basbaum, 2001).

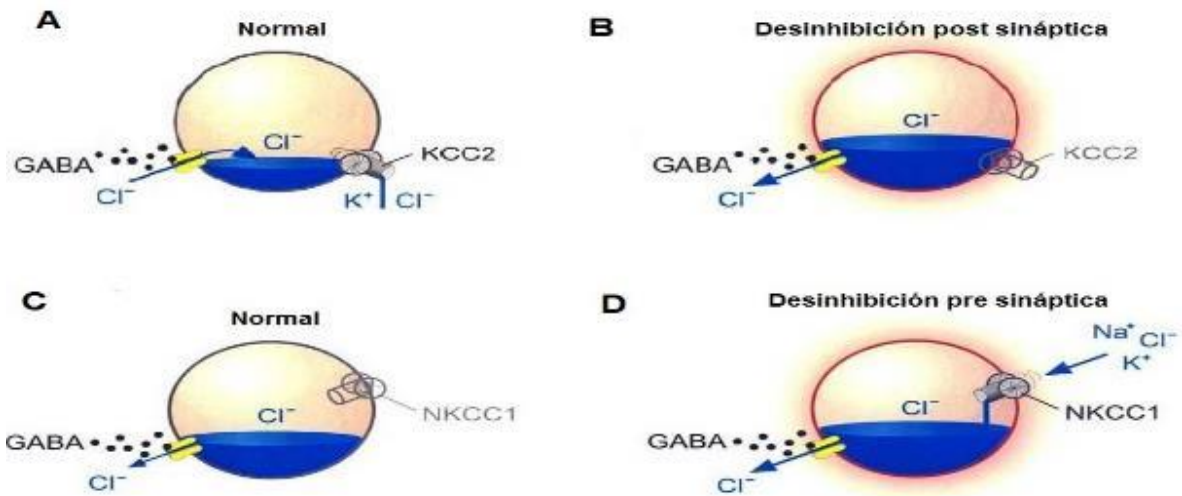


Figura 5. Desinhibición pre y postsináptica. **A)** En las neuronas del asta dorsal, el potencial de inversión del anión se mantiene hiperpolarizante debido a la extrusión de Cl^- a través de KCC2. **B)** La pérdida de la expresión de KCC2 causa una acumulación intracelular del Cl^- , lo que conlleva a invertir el flujo aniónico del GABA_A. **C)** En aferentes primarias, la activación del receptor GABA_A es despolarizante debido a un potencial de inversión de Cl^- ligeramente despolarizante, mantenido por el NKCC1. **D)** El aumento de la expresión o actividad del NKCC1 causa una acumulación adicional de Cl^- intracelular que produce una despolarización mejorada mediada por el receptor GABA_A. Modificado de Price *et al.*, 2005.

1.6 Co-transportador KCC2

El KCC2 es una proteína se codificada por el gen SLC12A y pertenece a la familia de nueve co-transportadores de catión- Cl^- . Hasta el momento se han identificado cuatro co-transportadores K^+ - Cl^- (KCC1-4). Los co-transportadores KCC1-3 regulan el volumen celular y la absorción/secresión de Cl^- y K^+ en células del músculo, corazón, páncreas, eritrocitos y riñón (Hebert *et al.*, 2004). De manera importante el KCC2 es la única isoforma que se expresa exclusivamente en el SNC. Este co-transportador se expresa en neuronas de la médula espinal, la corteza cerebral, el tallo cerebral, tálamo, bulbo olfatorio, neuronas piramidales del hipocampo, capa granular, retina, neuronas de Purkinje, hipotálamo y cerebelo (Lévi y Poncer, 2012; Wu *et al.*, 2016). El KCC2 es una glicoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 140 kDa, presenta 12 segmentos transmembranales flanqueados por dos dominios citoplasmáticos carboxilo- y amino -terminales de tamaño largo y

corto, respectivamente (**Figura 6 A**) (Lévi y Poncer, 2012). El KCC2 media el simporte de iones Cl^- y K^+ hacia el exterior gracias al gradiente electroquímico generado por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (**Figura 6 B**) (Price *et al.*, 2008; Chamma *et al.*, 2012). Las neuronas inmaduras del SNC tienen baja expresión de KCC2 por lo que los niveles intracelulares del Cl^- son altos. En estas condiciones, la actividad del receptor GABA_A es excitadora y contribuye al desarrollo de la morfología neuronal normal, al establecimiento de las conexiones sinápticas, la formación de espinas dendríticas maduras y a la formación de sinapsis excitadoras funcionales (Cancedda *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Chamma *et al.*, 2013). En contraste, la expresión de KCC2 incrementa en las neuronas maduras del SNC, lo que resulta en la reducción gradual del Cl^- y por lo tanto la activación del receptor GABA_A genera una corriente hiperpolarizante e inhibitoria en el SNC (Price *et al.*, 2008).

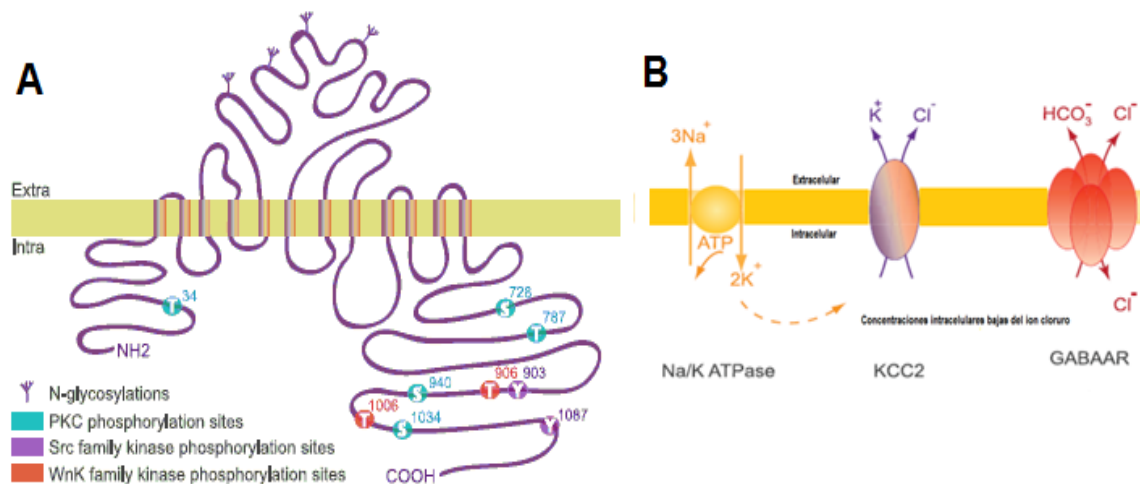


Figura 6. Estructura de KCC2. **A)** El co-transportador KCC2 es una proteína de gran tamaño (~140 kDa), posee 12 segmentos transmembranales. Está flanqueada por dos dominios citoplásmicos carboxilo y amino-terminal. Las regiones intracelulares son objetivos de varias cinasas que regulan su función. **B)** El KCC2 media el simporte de iones Cl^- y K^+ hacia el exterior de la neurona gracias al gradiente electroquímico generado por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa. Modificado de Chamma *et al.*, 2012.

La expresión y actividad de KCC2 están reguladas por mecanismos postraduccionales como fosforilación oligomerización, difusión membranal, entre otros (Lévi y Poncer, 2012). El patrón de fosforilación del carboxilo terminal de KCC2 juega un papel importante en la regulación de su expresión. La fosforilación de

KCC2 en la Serina 940, por la PKC, le confiere estabilidad membranal y de esta manera aumenta su expresión y actividad transportadora en la superficie celular (Lee *et al.*, 2007; Chamma *et al.*, 2013). En contraste, la desfosforilación de la Serina 940, por la proteína fosfatasa 1, disminuye la estabilidad membranal de KCC2 favoreciendo su endocitosis y degradación (Lee *et al.*, 2007; Chamma *et al.*, 2013; Kahle *et al.*, 2015). La expresión de KCC2, también está modulada por la activación de calpaína, que promueve la endocitosis y degradación de KCC2 (Puskarjov *et al.*, 2015; Kahle *et al.*, 2013; Sedmak *et al.*, 2016).

1.6.1 KCC2 y su interacción con BDNF

Es importante destacar que bajo condiciones de dolor, la expresión de KCC2 es regulada a la baja por el BDNF. El BDNF es una neurotrofina que juega un papel importante en la regulación de la supervivencia, crecimiento y diferenciación neuronal (Woolf, 2004). El BDNF también participa en la modulación de la información nociceptiva (Merighi *et al.*, 2008). El BDNF y su receptor TrkB están expresados en diversas estructuras implicadas en las vías del dolor, como GRD, médula espinal, tálamo, corteza somatosensorial y PAG, entre otras (Merighi *et al.*, 2008). Sin embargo, tanto el daño a los nervios espinales (Coull *et al.*, 2003, 2005) como la inflamación persistente (Zhang *et al.*, 2008, 2013) promueven la liberación de BDNF de la microglía activada. El BDNF a través de la unión con su receptor TrkB espinal disminuye la expresión de KCC2 y de ésta manera disminuye la inhibición GABAérgica y favorece la conducción de la información nociceptiva (**Figura 7**) (Kahle *et al.*, 2013).

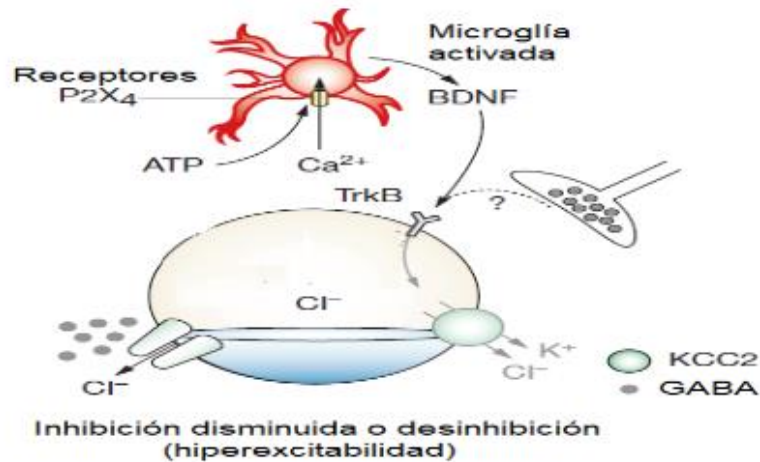


Figura 7. Microglía-BDNF-TrkB-KCC2. En condiciones patológicas, la microglía espinal que expresa a los receptores purinérgicos P2X4 se activa y secreta al BDNF. El BDNF actúa sobre su receptor TrkB en las neuronas de la médula espinal induciendo la disminución de la expresión de KCC2, por lo que el Cl^{-} intracelular se acumula e incrementa la excitabilidad de las neuronas de proyección. Modificado de Kahle *et al.*, 2008.

Bajo condiciones de dolor, las concentraciones de BDNF están aumentadas en la médula espinal (Geng *et al.*, 2010; Laste *et al.*, 2015; Filho *et al.*, 2016). El BDNF se une a su receptor TrkB y activa a la fosfolipasa C gamma (PLC γ). La PLC γ activa al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc), lo que a su vez, regula a la baja la expresión de KCC2 (Rivera *et al.*, 2002, 2004). Alteraciones en la expresión de KCC2 induce un cambio despolarizante mediado por el receptor GABA $_A$ y aumenta la excitabilidad de las neuronas de proyección (Coull *et al.*, 2003, 2005). De esta manera se favorece la información nociceptiva en modelos de dolor neuropático (Miletic y Miletic 2008) e inflamatorio (Zhang *et al.*, 2008). También, el BDNF aumenta la excitabilidad de las neuronas aferentes primarias (Zhou *et al.*, 2000; Matayoshi *et al.*, 2005) y activa a la microglía espinal (Zhou *et al.*, 2011), lo que facilita la liberación de diversos mediadores que contribuyen a la sensibilización central.

1.7 *Priming*

Cuando las neuronas sensoriales sufren una lesión o están expuestas a un estímulo nocivo pueden sufrir alteraciones que las hace más excitables ante un estímulo subumbral posterior. Este fenómeno se denomina "memoria del dolor" o "*priming*" (Price e Inyang, 2015). Se ha propuesto que los mecanismos que subyacen a la inducción del *priming* están mediados por diversas alteraciones celulares principalmente en las fibras aferentes primarias y neuronas de segundo orden (Price e Inyang, 2015). Un mecanismo propuesto en el *priming* es la translocación del ARNm (que permanece en estado latente) que codifica para proteínas que favorecen la excitabilidad neuronal a las espinas dendríticas. Esto facilitan la síntesis proteica y evita la necesidad de transportar el ARNm desde el cuerpo celular para efectuar cambios en la expresión génica (Price y Geranton, 2009). También, se ha propuesto que la activación de proteínas que favorecen la traducción del ARNm como la cinasa ERK (cinasa regulada por señales extracelulares) y mTORC1 (diana de rapamicina en células de mamífero) facilitan la síntesis proteica de las neuronas y de esta manera responden más rápido a un estímulo posterior (Melemedjian *et al.*, 2010). Además, la activación del factor de transcripción CREB regula cambios transcripcionales necesarios para el *priming* (Melemedjian *et al.*, 2014). La activación de las cinasas PKA, PKC ϵ , PKM ζ y PKC λ tiene un papel importante debido a que fosforilan diversas proteínas que favorecen la excitabilidad neuronal (Parada *et al.*, 2003; Melemedjian *et al.*, 2010; Bonin y de Konick, 2014; Sacktor, 2011; Price y Inyang, 2015; Burgos-Vega *et al.*, 2016). De manera importante, se ha demostrado que el BDNF participa en el *priming*. El BDNF activa vías de señalización mediadas por la cinasa PI3K/AKT, esto da como resultado una mejora de la traducción de la PKM ζ (cinasa implicada en el *priming*) en las sinapsis espinales (Melemedjian *et al.*, 2013; Burgos *et al.*, 2016).

1.8 Estrés

El estrés puede definirse como una respuesta fisiológica y/o de comportamiento que se presenta frente a una amenaza real o interpretada a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo (George, 2000). La respuesta al estrés implica la activación de respuestas conductuales y fisiológicas (neuronales, metabólicas y neuroendocrinas) que permiten al organismo responder al estresor de la manera más adecuada posible. De manera general, la respuesta al estrés consiste en tres fases:

1. Fase de alarma. En reacción a un estresor, el hipotálamo estimula a la glándula supra adrenal (en su parte medular) para secretar adrenalina, cuyo objetivo es suministrar energía y preparar al organismo para “luchar o huir”.
2. Fase de resistencia. Esta fase está regulada principalmente por la activación cortico-suprarrenal y la secreción de glucocorticoides. Esto mantiene constante el suministro de energía para nutrir principalmente a los músculos, el corazón y el cerebro.
3. Fase de agotamiento. Sobreviene si el estrés persiste y se acompaña de una alteración hormonal crónica, lo que puede llevar a procesos patológicos (Duval y Rabia, 2010).

Frente un estímulo estresor, estructuras cerebrales como la corteza prefrontal, la amígdala, el hipocampo y el núcleo accumbens se activan para modular la respuesta al estrés. Estas áreas del cerebro envían proyecciones al hipotálamo para controlar las respuestas al estrés a través de la activación del sistema nervioso autónomo (SNA) y del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal (Mora *et al.*, 2012).

1.8.1 Sistema nervioso autónomo

El SNA regula las funciones que ocurren sin control consciente y se compone de dos divisiones: la simpática y la parasimpática. Los estímulos externos que representan una amenaza o peligro (estímulo estresor) desencadenan la activación del sistema nervioso simpático a través de la activación de las neuronas localizadas en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. Estas neuronas activan a las neuronas preganglionares simpáticas localizadas en la médula espinal. Posteriormente, las neuronas preganglionares, a través de la liberación de acetilcolina, estimulan a las neuronas postganglionares localizadas fuera del SNC. Las neuronas postganglionares proyectan sus axones a los distintos órganos blanco (corazón, pulmones, hígado, vasos sanguíneos, entre otros) y liberan noradrenalina (Chabner y Knollman, 2012).

Por otra parte, las neuronas preganglionares simpáticas activan de manera directa a la médula adrenal para estimular la liberación de adrenalina a la circulación (Chabner y Knollman, 2012). La activación del sistema nervioso simpático aumenta la frecuencia cardíaca, el catabolismo, la dilatación bronquial y el flujo sanguíneo se modifica para aportar glucosa y oxígeno a los músculos y al cerebro. Todos estos cambios permiten al organismo “luchar o huir” (Chabner y Knollman, 2012).

1.8.2 Eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal

La respuesta de estrés también involucra la participación del eje hipotálamo-glándula pituitaria-médula suprarrenal (HPA). Esta respuesta se inicia tras la estimulación de las neuronas del PVN del hipotálamo para producir y secretar a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP). Estas hormonas viajan por el sistema portal hipofisario y estimulan a la hipófisis anterior (adenohipófisis) para secretar a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a la circulación general. La ACTH promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides, principalmente cortisol (corticosterona en roedores) de la corteza adrenal. La

activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal está controlada por un sistema de retroalimentación negativa, el cortisol circulante inhibe la producción de la CRH y ACTH a través de mecanismos que involucran la activación de receptores de glucocorticoides localizados en el hipotálamo y la hipófisis. Esta retroalimentación ayuda a mantener los niveles de cortisol normales (Carrasco *et al.*, 2003; Woda *et al.*, 2016).

Los glucocorticoides participan tanto en el control de la homeostasis como en la respuesta al estrés. En condiciones normales se secretan glucocorticoides de manera ultradiana y circadiana, es decir, los niveles fluctúan cada hora y cada 24 horas, respectivamente (Lightman, 2008). Los glucocorticoides actúan a través de dos tipos de receptores intracelulares pertenecientes a la familia de receptores citoplasmáticos: 1) los receptores de mineralocorticoides (MR) y 2) receptores de glucocorticoides (GR). Debido a su naturaleza lipofílica, los glucocorticoides difunden a través de la membrana celular hasta el citoplasma en donde se unen al GR. El complejo glucocorticoide-GR se transloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción. En el núcleo, este complejo interactúa con elementos de respuesta de glucocorticoides en el promotor de genes diana e induce la activación o represión transcripcional (Uchoa *et al.*, 2014).

Las funciones principales de los glucocorticoides en la periferia son efectos catabólicos y antiinflamatorios (Novais *et al.*, 2017; Madalena y Lerch, 2017). Los glucocorticoides modulan la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal, la respuesta a estímulos emocionales y ambientales y participan en el aprendizaje y formación de la memoria, entre otras (van Bodegom *et al.*, 2017).

2 ANTECEDENTES

2.1 Estrés y dolor

En las últimas décadas aumentó el interés de la investigación científica y clínica para la comprensión de las interacciones entre el estrés y el dolor. Este interés está impulsado por evidencia clínica y preclínica que demuestra que el estrés y las emociones negativas tienen profundos efectos en la nocicepción (Jennings *et al.*, 2014). El efecto del estrés agudo sobre la nocicepción es controvertido. Algunos estudios reportan que el estrés agudo induce analgesia tanto en humanos como en roedores (Butler y Finn, 2009). Por ejemplo, el estrés por la aplicación de un estímulo eléctrico durante 5 minutos en la pata (Zou *et al.*, 2001), el nado forzado durante tres minutos (Hayati *et al.*, 2008) y la restricción de movimiento durante 6 horas (Goyal *et al.*, 2007) induce analgesia en ratas. Además, el estrés agudo (15 minutos de cálculos aritméticos mentales acompañado de ruido) induce analgesia en humanos (Flor *et al.*, 2002). Los estudios farmacológicos y neuroquímicos han demostrado que la analgesia inducida por estrés está mediada por el aumento en el sistema opioide, monoaminérgico, cannabinoide, GABAérgico y a la disminución de los niveles de glutamato (Butler y Finn, 2009). Por otro lado, existe evidencia de que el estrés agudo induce hipersensibilidad nociceptiva. Por ejemplo, el estrés por evitación al agua durante 60 minutos (Million *et al.*, 2013), la interrupción del sueño durante 8 horas (Wodarski *et al.*, 2015) e inmovilización durante dos horas (Gilet *et al.*, 2014) induce hipersensibilidad en ratas. Esta controversia podría explicarse por la duración y estímulo estresor empleado. Por el contrario, la evidencia es consistente que el estrés crónico induce hipersensibilidad. Por ejemplo, se reportó que la exposición crónica a estresores físicos y psicológicos producen hiperalgesia (aumento de la sensibilidad a estímulos dolorosos) y/o alodinia (dolor desencadenado por estímulos inocuos) tanto en humanos como en roedores (Gibbons *et al.*, 2012; Crettaz *et al.*, 2013; Jennings *et al.*, 2014). Además, la exposición a un estresor social (hablar en público y realizar ejercicios aritméticos) induce alodinia a estímulos térmicos tanto en voluntarios sanos como en pacientes con dolor crónico (Crettaz *et al.*, 2013). Mientras que la exposición a estrés

fisiológico (hipoglucemia) produjo hiperalgesia a estímulos térmicos en voluntarios sanos (Gibbons *et al.*, 2012). También, se ha observado que el estrés exagera la hiperalgesia de patologías dolorosas crónicas como la fibromialgia, el síndrome de colon irritable, artritis reumatoide y cefalea (Bardin *et al.*, 2009; Jennings *et al.*, 2014).

A pesar de que la respuesta al estrés es fundamental porque ayuda al ser humano a la supervivencia, cuando el estrés se vuelve crónico puede causar diversas alteraciones perjudiciales para el organismo. En este sentido, se sabe que la exposición crónica a estímulos estresantes altera la función del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal, sistema nervioso simpático y la respuesta inmune (Khasar *et al.*, 2005, 2008, Chapman *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2014; Woda *et al.*, 2016). Esto resulta en un aumento crónico de los niveles de glucocorticoides, catecolaminas y mediadores proinflamatorios (Khasar *et al.*, 2008; Gameiro *et al.*, 2005, 2006; Rivat *et al.*, 2010; Guevara *et al.*, 2015). Se ha reportado que estas moléculas activan a sus respectivos receptores expresados en fibras aferentes primarias y ejercen efectos pronociceptivos (Hartung *et al.*, 2014; Shaqura *et al.*, 2016; Ciszek *et al.*, 2017). En condiciones fisiológicas, los glucocorticoides tienen efectos antiinflamatorios. Sin embargo, bajo condiciones de estrés crónico los glucocorticoides tienen efectos proinflamatorios en el SNC (Frank *et al.*, 2014), lo que podría contribuir al desarrollo de la hipersensibilidad inducida por estrés.

El estrés modifica el funcionamiento de diversas estructuras involucradas en la transmisión del dolor (Jennings *et al.*, 2014). Por ejemplo, la exposición a estrés crónico disminuye la expresión del receptor a cannabinoide 1 (CB1) y aumenta la expresión el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) en GRD (Hong *et al.*, 2009). Además, el estrés disminuye la señalización GABAérgica, aumenta las concentraciones de glutamato y de mediadores proinflamatorios en la médula espinal (Rivat *et al.*, 2010; Quintero *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014; Lian *et al.*, 2017). El estrés también aumenta la expresión de colecistocinina (CCK) en la RVM (Rivat *et al.*, 2010) y disminuye la expresión del transportador de aminoácidos excitadores 2 (EAAT2) y la proteína ácida fibrilar de la glía (GFPA) (Imbe *et al.*, 2012) en la PAG.

El estrés disminuye la disponibilidad del receptor μ -opioides en la amígdala (Zubieta *et al.*, 2001) y causa reorganización estructural y funcional en diversas estructuras cerebrales como la amígdala, corteza anterior del cíngulo, corteza prefrontal, entre otras (Hayes *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017) (**Figura 8**). Estas alteraciones modifican la capacidad del cuerpo para suprimir la transmisión de la información nociceptiva aumentando la percepción del dolor.

Los glucocorticoides, catecolaminas, citocinas, quimiocinas, péptidos opioides, glutamato, GABA, CCK, monoaminas y endocannabinoides desempeñan un papel clave en el procesamiento de la respuesta al estrés y dolor. La exposición a estrés crónico altera los niveles de estos mediadores que a su vez influyen en el resultado de las interacciones estrés-dolor (Bardin *et al.*, 2009; Bradesi *et al.*, 2011; Le Roy *et al.*, 2011; Ohashi *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2012).

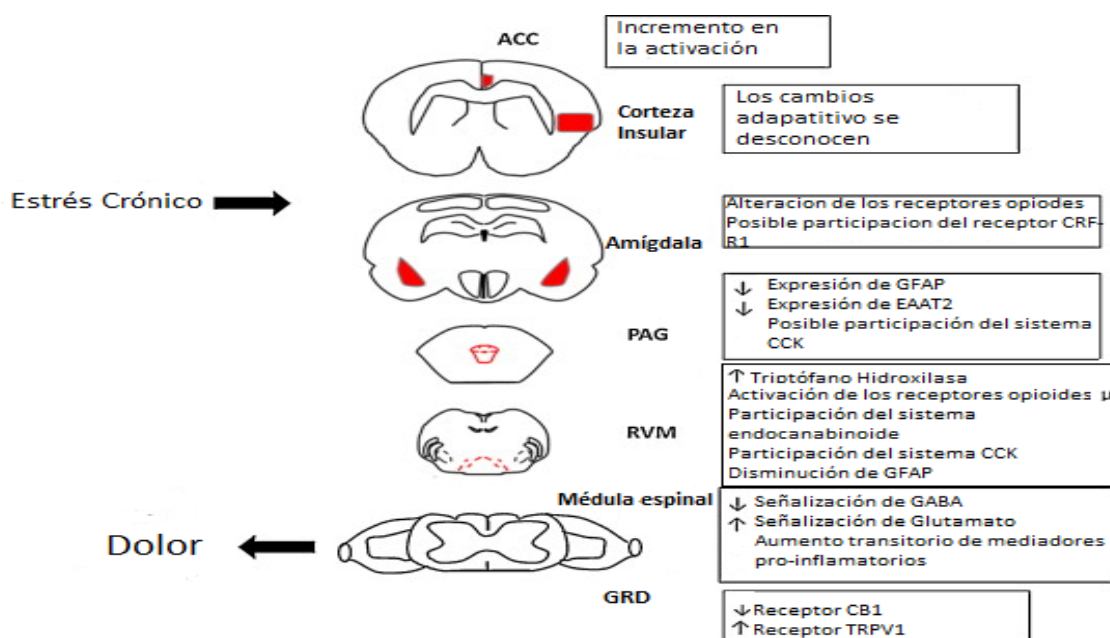


Figura 8. Estrés y dolor. Estructuras y mecanismos neurobiológicos que se modulan en la hiperalgesia inducida por estrés crónico. ACC (corteza anterior del cíngulo), PAG (sustancia gris periacueductal), RVM (médula rostral ventromedial), GRD (ganglio de la raíz dorsal), GABA (ácido γ -aminobutírico), CRF-R1 (receptor del factor liberador de corticotropina subtipo 1), EAAT2 (transportador aminoácidos excitadores 2), CCK (colecistocinina), TRPV1 (receptor de potencial transitorio V1) y GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía). Modificado de Jennings *et al.*, 2014.

2.2 Modelos de hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés en animales

Existe diversos modelos en animales que se utilizan para el estudio de la relación estrés-dolor. Estos modelos implican principalmente la aplicación repetida de un factor estresante (psicológico y/o físico) durante días o semanas, en combinación con una prueba para evaluar el dolor. Esta aproximación nos permite estudiar el impacto del estrés en la respuesta al dolor, los sustratos neuronales subyacentes y los mecanismos neurobiológicos implicados (Jennings *et al.*, 2014). Además contribuyen a mejorar la comprensión del dolor y proporcionar una base para las terapias farmacológicas. Entre de los modelos de dolor de estrés y dolor se encuentran los de hipersensibilidad nociceptiva inducida mediante: restricción de movimiento, nado forzado, exposición a temperaturas frías y restricción de agua, entre otros (Boccalon *et al.*, 2006; Bardin *et al.*, 2009; Rivat *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010; Abdelhamid *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2016).

Modelo de hipersensibilidad nociceptiva inducida mediante estrés crónico por restricción de movimiento en ratas

La restricción de movimiento representa un estímulo estresor potente en varias especies animales debido a que provoca alteraciones hormonales y conductuales, induce cambios funcionales en el SNC y SNP (Porro y Carli, 1988) y activa de manera eficiente al sistema nervioso simpático y al eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal (respuesta al estrés) (Goldstein y Kopin, 2007).

Se ha comprobado que el estrés crónico por restricción de movimiento bajo diferentes protocolos (frecuencia y duración de la restricción) produce hipersensibilidad nociceptiva en la rata (Tabla 1). En general, el estrés crónico induce hiperalgesia térmica y mecánica, así como alodinia mecánica en diferentes cepas de ratas (Gamero *et al.*, 1998; da Silva *et al.*, 2003; Gameiro *et al.*, 2005; Imbe *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Gameiro *et al.*, 2006; Bardin *et al.*, 2009; Spezia *et al.* 2012; Li *et al.*, 2016; Velazquez-Lagunas, 2017).

La hipersensibilidad nociceptiva inducida mediante estrés crónico por restricción de movimiento representa un modelo adecuado para estudiar cómo el estrés genera y/o exacerba los síndromes de dolor funcional como la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, el síndrome del colon irritable, entre otros. Hay evidencia que muestra que este modelo simula los síntomas y características que se reportan en los pacientes. Por ejemplo, los animales presentan 1) hipersensibilidad nociceptiva generalizada en ausencia de daño al tejido o inflamación, 2) conductas tipo depresión, 3) conductas tipo ansiedad, 4) desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal y 5) responden al tratamiento farmacológico con agonista opiodes e inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina (Gameiro *et al.*, 2005, 2006; Kumari *et al.*, 2007; Quintero *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2012).

Tabla 1. El estrés crónico por restricción de movimiento produce hipersensibilidad nociceptiva.

Especie, sexo, cepa	Frecuencia y duración	Prueba de dolor	Resultados	Referencia
Ratas Wistar machos y hembras (150-230 g)	1 h al día por 40 días	Retiro de la cola	Hiperalgnesia térmica únicamente en machos	Gamaro <i>et al.</i> , 1998
Ratas Wistar macho (200-230 g)	1 h diaria durante 5 días por 8 semanas	Formalina y retiro de la cola	Hiperalgnesia térmica y química	da Silva <i>et al.</i> , 2003, Gameiro <i>et al.</i> , 2005
Ratas Sprague-Dawley macho (90-120 g)	6 horas por 1, 2 o 3 semanas	Retiro de la cola	Hiperalgnesia térmica después de 2 y 3 semanas de restricción	Imbe <i>et al.</i> , 2004
Ratas Sprague-Dawley macho (150-200 g)	90 min por 7 días	Retiro de la cola	Hiperalgnesia térmica	Costa <i>et al.</i> , 2005
Ratas Wistar macho (200-230 g)	1 h, 5 días por 40 días	Formalina	Hiperalgnesia química	Gameiro <i>et al.</i> , 2006
Ratas Sprague-Dawley macho (160-180 g)	1 h durante 4 días por 5 semanas	Von Frey, retiro de la cola, acetona, formalina	Hiperalgnesia química, alodinia térmica (calor y frío) y mecánica	Bardin <i>et al.</i> , 2009
Ratas Wistar macho (180-230 g)	1 h durante 5 días por 11 semanas	Von Frey y plancha caliente	Alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica	Spezia <i>et al.</i> , 2012
Ratas Sprague-Dawley macho (250-300 g)	2 u 8 h durante 3 semanas	Von Frey y plancha caliente	Hiperalgnesia mecánica y térmica	Li <i>et al.</i> , 2016
Ratas Wistar hembra (230-240 g)	2 h durante 4 semanas	Von Frey y plancha caliente	Alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica	Velazquez-Lagunas, 2017

2.3 KCC2 y dolor

El KCC2 es una proteína transportadora que desempeña un papel importante en la modulación del dolor a través de la modulación de la inhibición GABAérgica y que esta función a su vez es modulada por BDNF. La evidencia que sustenta esta hipótesis se describe a continuación. El KCC2 está expresado en sitios relacionados con la nocicepción como en la médula espinal, PAG, corteza somatosensorial, tálamo e hipocampo, entre otros (Zhang *et al.*, 2013; Hewitt *et al.*, 2009; Janssen *et al.*, 2012; Eto *et al.*, 2012). Además, el bloqueo farmacológico de KCC2 espinal induce conductas nociceptivas en animales intactos (Zhang *et al.*, 2008; Jolivald *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016), lo que sugiere que el KCC2 participa en la modulación de la información nociceptiva.

Se ha reportado que la pérdida de la inhibición GABAérgica es un mecanismo clave para el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico (Costigan *et al.*, 2009). El daño a los nervios periféricos (Coull *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2012; Mòdol *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016), la neuropatía diabética (Jolivald *et al.*, 2008) y la inflamación persistente (Nomura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Eto *et al.*, 2012) disminuyen la expresión de KCC2 en neuronas del asta dorsal de médula espinal. Esta regulación a la baja de KCC2 conduce a un cambio despolarizante del potencial de equilibrio del Cl⁻. En consecuencia, la actividad GABAérgica se vuelve excitadora y se facilita la conducción de la información nociceptiva (Eto *et al.*, 2012; Ferrini *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). Está reportado que la activación de la microglía y la liberación de BDNF tiene un papel importante en este proceso (Coull *et al.*, 2003, 2005). El dolor neuropático (Coull *et al.*, 2003, 2005; Miletic y Miletic, 2008), inflamatorio (Zhang *et al.*, 2008) e hipersensibilidad inducida por morfina (Ferrini *et al.*, 2013) promueven la liberación de BDNF de la microglía. El BDNF se une a su receptor TrkB, expresado en neuronas del asta dorsal de la médula espinal, y regula a la baja la expresión de KCC2. Estos datos sugieren que el KCC2 contribuye al mantenimiento de las conductas nociceptivas en diferentes modelos de dolor. Sin embargo, sólo hay un estudio que demuestra que en el dolor funcional inducido mediante estrés por evitación al agua durante 10 días disminuye

el ARNm y la proteína de KCC2 espinal (Tang *et al.*, 2015). Por lo que no está claro si el BDNF y KCC2 participan en el dolor funcional. En la **Tabla 2** se muestran diversos estudios en donde se reporta que el dolor neuropático, inflamatorio y funcional regula a la baja la expresión de KCC2 espinal en diferentes cepas de rata y ratón. La reducción en la expresión de KCC2 altera la homeostasis del Cl⁻ e induce pérdida de la inhibición postsináptica y esto contribuye a las conductas nociceptivas.

Tabla 2. El dolor crónico reduce la expresión de KCC2 espinal en la rata y ratón.

Modelo de dolor/ especie	Tejido	Técnica	Resultados en la expresión	Resultados farmacológicos/ electrofisiológicos	Referencia
Dolor neuropático/ PNI (Ratas Sprague Dawley)	En la parte ipsilateral de la médula espinal	<i>Western Blot</i> <i>Voltage Clamp/ célula completa</i>	La expresión de KCC2 disminuye en un 30%.	La administración de un bloqueador de KCC2 (DIOA) o de un oligodeoxinucleótido anti-KCC2 induce hiperalgesia en ratas <i>naïve</i> . Aumento en los niveles intracelulares de Cl ⁻ lo que desencadena excitabilidad mediada por GABA.	Coull <i>et al.</i> , 2003
Neuropatía diabética/ administración de estreptozocina (Ratas Sprague-Dawley)	Médula espinal	<i>Western Blot</i>	La expresión de KCC2 disminuye en un 25%.	La administración de un bloqueador de KCC2 (DIOA) induce hiperalgesia en ratas <i>naïve</i> .	Jolivalt <i>et al.</i> , 2008
Dolor neuropático/CCI Ratas macho Sprague Dawley	Médula espinal	<i>Western Blot</i>	La expresión de KCC2 disminuye en un 45%.	La hipersensibilidad nociceptiva y la regulación a la baja de KCC2 se previenen con el antagonista del receptor TrkB.	Millettic y Millettic, 2008
Dolor neuropático/ PNI (Ratas Sprague-Dawley)	Médula espinal, tálamo y corteza somatosensorial I	<i>Western Blot</i> e inmunohistoquímica	La expresión de KCC2 disminuye en un 75%.		Mòdol <i>et al.</i> , 2014
Dolor neuropático/ SCI (Ratas Sprague-Dawley)	Médula espinal	<i>Western Blot</i>	La expresión de KCC2 disminuye en un 50%.	La administración de un bloqueador de KCC2 (DIOA) induce hipersensibilidad nociceptiva en animales intactos.	Huang <i>et al.</i> , 2016

ANTECEDENTES

Modelo de dolor/ especie	Tejido	Técnica	Resultados en la expresión	Resultados farmacológicos/ electrofisiológicos	Referencia
Dolor neuropático/ CCI. (Ratas Sprague Dawley)	Médula espinal	<i>Western Blot</i>	La expresión de KCC2 disminuye en un 20%.		Li <i>et al.</i> , 2018
Dolor inflamatorio/ Formalina (Ratas Sprague Dawley)	En la parte ipsilateral de la médula espinal	Inmunohistoquímica PCR	La expresión de KCC2 disminuye en un 20% en la fase 1. El ARNm de KCC2 no cambia.		Nomura <i>et al.</i> , 2006
Dolor inflamatorio/ CFA (Ratas Sprague Dawley)	En la parte ipsi y contralateral de la médula espinal	<i>Western Blot</i> e inmunohistoquímica	La expresión de KCC2 disminuye en un 20% (día 1 y hasta 14).	La hipersensibilidad nociceptiva y la regulación a la baja de KCC2 se previenen con el antagonista del receptor TrkB. La administración de un bloqueador de KCC2 (Furosemida) induce hiperalgesia en ratas <i>naïve</i> .	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Dolor inflamatorio/ Formalina (Raton C57)	En la parte ipsilateral de la médula espinal	PCR	El ARNm de KCC2 disminuye en un 20% en la fase 1.	La administración de un oligodeoxinucleótido anti-KCC2 induce hiperalgesia en ratones <i>naïve</i> .	Wu <i>et al.</i> , 2009
Hiperalgesia inducida por morfina (Ratas Sprague-Dawley)	Médula espinal	<i>Western Blot</i> <i>Voltage Clamp</i> / célula completa	La expresión de KCC2 disminuye en un 30%.	El bloqueo del receptor TrkB restablece la homeostasis del Cl ⁻ y la hipersensibilidad nociceptiva. Aumento en los niveles intracelulares de Cl ⁻ .	Ferrini <i>et al.</i> , 2013
Dolor funcional/ estrés por evitación al agua durante 10 días (Ratas Wistar)	Médula espinal	<i>Western Blot</i> e inmunohistoquímica PCR <i>Voltage Clamp</i> / célula completa	La expresión de KCC2 disminuye en un 30%. El ARNm de KCC2 disminuye en un 10%.	La administración de un bloqueador de KCC2 (DIOA) induce hipersensibilidad nociceptiva y aumenta los niveles intracelulares de Cl ⁻ en animales intactos. Aumento en los niveles intracelulares de Cl ⁻ .	Tang <i>et al.</i> , 2015

2.4 KCC2 y estrés

La exposición a estrés crónico desencadena modificaciones en el organismo las cuales pueden contribuir para el desarrollo de estados patológicos (Woda *et al.*, 2016). Por ejemplo, diferentes protocolos de inducción de estrés crónico disminuyen la expresión de KCC2 en las neuronas del hipocampo, PVN del hipotálamo y asta dorsal de la médula espinal (**Tabla 3**) (Miller y Maguire, 2014; Tsukahara *et al.*, 2015, 2016; Gao *et al.*, 2016). Además, el estrés crónico impredecible (rotación, frío, luz, ruido forzado, inmovilización, privación de agua y comida, aislamiento social) reduce la expresión de KCC2 en el PVN del hipotálamo y esto causa hiperreactividad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal en ratas (Gao *et al.*, 2016). También, el estrés crónico por derrota social reduce la expresión de KCC2 en el PVN del hipotálamo, lo que a su vez induce conductas tipo depresivas en ratones (Miller y Maguire, 2014). Además, el estrés crónico por administración forzada de agua disminuye la expresión de KCC2 en el hipocampo y esto se relaciona con déficits cognitivos y de sociabilidad en ratones (Tsukahara *et al.*, 2015, 2016). Estos datos sugieren que el estrés crónico modula a la baja la expresión del co-transportador KCC2 en diferentes estructuras cerebrales implicadas en la respuesta al estrés, lo que a su vez contribuye al desarrollo de diversas patologías. Sin embargo, a pesar de que los estudios mencionados previamente demuestran que el estrés crónico disminuye la expresión de KCC2 en estructuras implicadas en las vías de señalización del dolor, no está claro si esto contribuye a la hipersensibilidad inducida por estrés. A la fecha sólo hay un reporte que demuestra que el estrés crónico por evitación al agua durante 10 días regula a la baja el ARNm y la proteína de KCC2 en la médula espinal (Tang *et al.*, 2015), una estructura clave para la modulación de la nocicepción.

ANTECEDENTES

Tabla 3. El estrés disminuye la expresión de KCC2 en el PVN del hipotálamo, hipocampo y médula espinal.

Estímulo estresor/especie	Tejido	Técnica	Resultados en la expresión	Resultados farmacológicos/ electrofisiológicos	Referencia
Estrés por derrota social (14 días). Ratón (C57/BL6J) macho	PVN del hipotálamo	<i>Western Blot</i>	La expresión de KCC2 total y fosforilado disminuye en un 10 y 20% respectivamente.	Conductas tipo depresivas.	Miller y Maguire, 2014
Estrés por evitación al agua (10 días). Ratas macho Wistar	Médula espinal	<i>Western Blot</i> e inmunohistoquímica PCR <i>Voltage Clamp/</i> célula completa	La expresión de KCC2 disminuye en un 30% El ARNm de KCC2 disminuye en un 10%.	La administración de un bloqueador de KCC2 (DIOA) induce hipersensibilidad y aumenta los niveles intracelulares de Cl ⁻ en animales intactos. Aumento en los niveles intracelulares de Cl ⁻	Tang <i>et al.</i> , 2015
Estrés por administración forzada de agua (25 días). Ratón (C57/BL6J) hembra	Células granulares y piramidales de hipocampo.	Inmunohistoquímica	KCC2 disminuye en un 20%.	Déficits cognitivos y de sociabilidad.	Tsukahara <i>et al.</i> , 2015, 2016
Estrés impredecible (rotación, frío, luz, ruido forzado, inmovilización, privación de agua y comida, aislamiento social) (11 días). Ratas macho Sprague-Dawley	PVN del hipotálamo.	<i>Western Blot</i> e inmunohistoquímica <i>Voltage Clamp/</i> célula completa	KCC2 disminuye en un 45%.	Hiperreactividad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula supra adrenal. Aumento en los niveles intracelulares de Cl ⁻ y pérdida de la inhibición GABAérgica.	Gao <i>et al.</i> , 2016

Los estudios mencionados anteriormente demuestran que la disminución de la expresión de KCC2 espinal conlleva a la pérdida de los mecanismos inhibidores en modelos de dolor neuropático e inflamatorio. También, se demuestra que el estrés crónico induce hipersensibilidad y regula a la baja la expresión de KCC2 en estructuras implicadas en la respuesta al estrés y al dolor. Sin embargo, a pesar de estos reportes, no existen evidencia contundente que relacionen la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés con la pérdida de los mecanismos inhibidores. Se ha reportado que la activación de la vía BDNF-TrkB-KCC2-GABA lleva a la desinhibición postsináptica en diversos modelos de dolor. De manera interesante, tanto el BDNF como el KCC2 están implicados en la respuesta al estrés (Lippman *et al.*, 2007; Hewitt *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2016). Con base en esto, se ha sugerido la hipótesis de que la hipersensibilidad inducida mediante estrés crónico podría explicarse mediante la pérdida de los mecanismos inhibidores. La propuesta consiste en que la exposición a estímulos estresantes promueve la liberación de BDNF. La unión de este a su receptor TrkB activaría cascadas de señalización que podrían reducir la expresión de KCC2 y como consecuencia aumentarían los niveles intracelulares de Cl⁻ en las neuronas espinales. Ésto a su vez modificaría las acciones inhibitoras mediadas por el receptor GABA_A (Dai y Ma, 2014). Sin embargo, esta hipótesis no se ha comprobado.

3 JUSTIFICACIÓN

El estrés agudo es una respuesta fundamental que ayuda a mantener la integridad y la supervivencia del individuo. En contraste, el estrés crónico produce diversas alteraciones que generan hipersensibilidad nociceptiva y/o exacerban estados patológicos crónicos como los síndromes de dolor funcional. Se sabe que uno de los mecanismos que favorecen el dolor crónico es la desinhibición espinal mediada en parte por la disminución de la expresión de KCC2. Esta regulación a la baja de KCC2 está mediada por la vía BDNF-TrkB-KCC2-GABA en modelos de dolor neuropático e inflamatorio. Sin embargo, se desconoce si la activación de esta vía participa en el desarrollo y mantenimiento del dolor funcional. Demostrar la participación de KCC2 espinal en este tipo de dolor podría aportar información para una mejor comprensión de los síndromes de dolor funcional y proporcionaría un nuevo blanco terapéutico para su prevención y tratamiento.

4 HIPÓTESIS

El estrés crónico por restricción de movimiento induce hipersensibilidad nociceptiva, mediante el aumento del BDNF, lo que conlleva a disminuir la expresión del co-transportador KCC2.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Determinar la participación de BDNF y KCC2 en la alodinia táctil e hiperalgesia térmica en un modelo de dolor inducido por estrés crónico mediante la restricción de movimiento en la rata.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés crónico mediante la restricción de movimiento en la rata.
2. Evaluar mediante herramientas farmacológicas, la contribución del co-transportador KCC2 espinal en el mantenimiento de alodinia táctil en el modelo de dolor inducido por estrés mediante restricción de movimiento.
3. Determinar si el estrés crónico por restricción de movimiento produce *priming* dependiente de KCC2.
4. Determinar, mediante ELISA, el contenido tisular de BDNF en la médula espinal de ratas expuestas a estrés crónico.
5. Determinar, mediante *Western Blot*, la expresión de la proteína del co-transportador KCC2 en la médula espinal de ratas expuestas a estrés crónico.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar (220-230 g). Todos los animales se obtuvieron y mantuvieron en el bioterio del Cinvestav (Unidad Coapa). Las ratas se alojaron en cajas de acrílico en un cuarto con condiciones de temperatura y humedad relativamente controladas en ciclos de luz y oscuridad 12/12 h con una dieta estándar y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (IASP, 1983). Además, el presente trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales del Cinvestav (Protocolo 0042-13).

6.2 Fármacos

El VU0463271 (Tocris, Bristol) y DIOA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), bloqueadores de KCC2, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 20 y 70 % respectivamente. El CLP 257 (Tocris, Bristol), activador de KCC2, se disolvió en DMSO al 100%. La minociclina (Sigma-Aldrich, St. Louisi), el inhibidor de la microglía, se disolvió en DMSO al 20%. Todos los fármacos se administraron por vía intratecal (i.t.) en un volumen de 10 μ l. La elección de las dosis de DIOA y minociclina se basó en estudios previos (Huang *et al.*, 2016; Barragán-Iglesias *et al.*, 2014). La elección de las dosis de VU0463271 y CLP 257 se realizó con base en experimentos piloto realizados en el laboratorio.

6.1 Modelo de hipersensibilidad inducida mediante estrés crónico por restricción de movimiento

Para inducir hipersensibilidad nociceptiva por restricción de movimiento, los animales se colocaron 2 horas al día (10:00am a 12:00pm) durante 28 días, en restrictores de movimiento de acrílico transparente, los cuales se ajustaron de al tamaño del animal. Los animales se regresaron a su caja habitación, inmediatamente después del periodo de restricción.

6.2 Evaluación de las conductas nociceptivas

6.2.1 Evaluación de la alodinia táctil

Para la evaluación de la alodinia táctil las ratas se ambientaron en una caja de acrílico con fondo de malla metálica durante una hora. Posteriormente se determinó el 50% del umbral de retiro de las extremidades posteriores estimulando con una serie de filamentos calibrados de von Frey (fuerza del filamento de 0.4 a 15 g) con el método denominado up and down. La prueba consistió en estimular durante 10 segundos la parte media de la superficie plantar. Se consideró una respuesta positiva a la conducta de retiro de la pata y se señaló con “x”, mientras que una respuesta negativa consistió en no retirar la pata y se denotó como “0”. A partir de un cambio en la respuesta (“0” o “x” o viceversa), se realizaron 4 evaluaciones adicionales. Con estos datos se determinó el 50% del umbral de retiro, el cual se define como la intensidad de estimulación necesaria para generar una respuesta en el 50% de las aplicaciones para cada animal (Chaplan *et al.*, 1994).

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

Dónde:

Xf: valor del último filamento de von Frey usado (en unidades de log)

K: factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado en base al patrón de respuestas positivas y negativas

δ: diferencias de promedio entre estímulos (unidades log).

6.2.2 Evaluación de la hiperalgesia térmica

Se midió la latencia de retiro de la pata ante un estímulo de calor radiante según lo reportado previamente (Dirig *et al.*, 1997). Las ratas se colocaron en cajas de acrílico transparente sobre una superficie de vidrio mantenida a una temperatura de 28-30°C por un periodo de una hora. Después, se aplicó el estímulo de calor radiante a cada pata trasera de manera alternada y se midió la latencia de retiro. Se realizaron tres mediciones en cada pata con un intervalo de 10 minutos entre cada

una. Se estableció un límite de 20 segundos de exposición para evitar daño al tejido. La latencia de retiro de la pata de cada rata se calculó como la media de tres ensayos.

6.3 Extracción de tejido

Las ratas intactas y estresadas a diferentes tiempos se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los GRDs (L4-L6) y la parte lumbar de la médula espinal (L1-S1) en su porción dorsal. Inmediatamente, el tejido se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó en tubos de centrifugación a -70°C hasta su uso. Las muestras se homogenizaron con 300 μl de amortiguador RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 1%, SDS 0.1%) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina 6.8 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 4 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina "A" 4 $\mu\text{g/ml}$, SBTI 4 $\mu\text{g/ml}$ y PMSF 2 Mm, NaVO_4 2 Mm, NaF 50 mM, NaPPi 5 mM y β -glicerofosfato). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta la cuantificación de proteínas totales.

6.4 Determinación de la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado

6.4.1 Western Blot

Inicialmente se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford utilizando el *kit* de BIO-RAD (Cat # 500-0001 BioRad, California). Para el *Western blot*, se tomaron volúmenes equivalentes a 50 μg de proteína total y las muestras se calentaron durante treinta minutos a 60°C . Posteriormente se sometieron a separación por electroforesis de dos dimensiones (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 8%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), las cuales se bloquearon a 4°C durante dos horas con leche descremada al 5%. Luego, se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario dirigido contra KCC2 (rabbit anti-KCC2; Cat. # 07-432, 1:12,000, EMD Millipore, CA) o contra KCC2 fosforilado en la Serina 940 (rabbit anti-

KCC2; Cat. NBP2-29513, 1:10,000, Novus Biologicals, Cambridge). Para la inmunodetección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-rabbit; Cat. # 711-035-152, 1: 6,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove). Finalmente, mediante quimioluminiscencia (Western Lightning® Plus-ECL, MA) se obtuvo una imagen fotográfica (ChemiDoc™ XRS+ ImagingSystem, Bio-Rad, CA) y posteriormente se realizó el análisis densitométrico de las bandas (ImageLab™ versión 5.0, Bio-Rad, CA). Asimismo, se utilizó al anticuerpo contra β -actina (mouse anti-actin; Cat. # 1: 10, 000, GenTex, CA) y su respectivo anticuerpo secundario (anti-mouse; Cat. # 115-035-003, 1:6,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove). La expresión de β -actina se usó como control de carga para normalizar los niveles de la expresión de las proteínas.

6.5 Cuantificación de las concentraciones tisulares de BDNF

6.5.1 ELISA

Se obtuvo la porción dorsal de la médula espinal de ratas intactas y estresadas a diferentes tiempos como se menciona previamente. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford utilizando el *kit* de BIO-RAD (Cat # 500-0001 BioRad, California). El contenido tisular de BDNF se determinó mediante ensayo inmunoenzimático según las instrucciones del fabricante (*kit*-BDNF ELISA, Abcam, Cambridge). Los niveles de BDNF se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína total y al peso del tejido.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir del 50 % de umbral de retiro o de la latencia de retiro se construyeron cursos temporales de las conductas nociceptivas en función del tiempo. Posteriormente se determinó el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales mediante el método de los trapecoides. Los datos se reportan como la media ($n=6$) \pm error estándar de las unidades de área (UA) para cada grupo. En el caso de la expresión de la proteína de KCC2 total y KCC2 fosforilado, se determinó el % de intensidad relativa y los resultados se reportaron como la media ($n=3$) \pm error estándar para cada grupo. Para BDNF, se determinaron las concentraciones de BDNF (ng/mg tejido) y los resultados se reportaron como la media ($n=3$) \pm error estándar para cada grupo.

Para definir las diferencias entre los grupos, se empleó t de *Student* o análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de la prueba de Tukey o Dunnet. Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico *Graph Prism 6.0* (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

8 DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Desarrollo del modelo de dolor inducido por estrés crónico

Para la caracterización del curso temporal de la hipersensibilidad nociceptiva en el modelo de estrés por inmovilización, a los animales se les restringió el movimiento 2 horas al día durante 28 días o se mantuvieron en su caja para el grupo control. Se les determinó el desarrollo de alodinia táctil e hiperalgesia térmica a diferentes tiempos (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días) (**Figura 9**). La medición de alodinia táctil e hiperalgesia térmica se realizó antes de la siguiente sesión de estrés para evitar el efecto agudo del estrés. Se utilizaron grupos independientes ($n=6$) para cada condición experimental (*Naïve* y estrés).

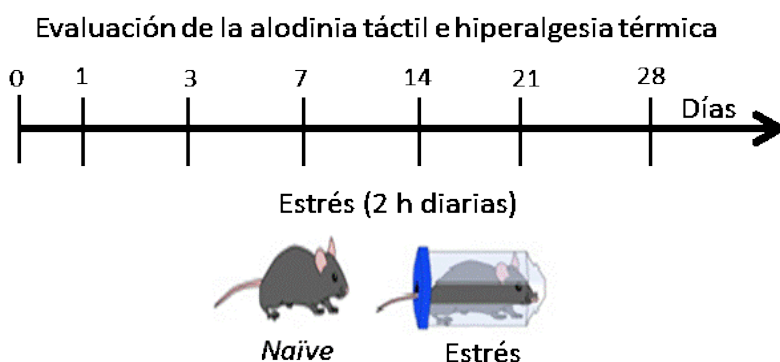


Figura 9. Diseño experimental de la evaluación conductual del desarrollo de hipersensibilidad nociceptiva inducido por estrés crónico.

8.2 *Priming* inducido por estrés crónico

A un grupo de animales ($n=6$) se les restringió el movimiento 2 horas al día durante 28 días. Posteriormente, la restricción de interrumpió por 30 días (día 29 al 58) y posteriormente los animales se reexpusieron al estímulo estresor por cinco días más. Se les determinó la alodinia táctil e hiperalgesia térmica a diferentes tiempos (**Figura 10**).

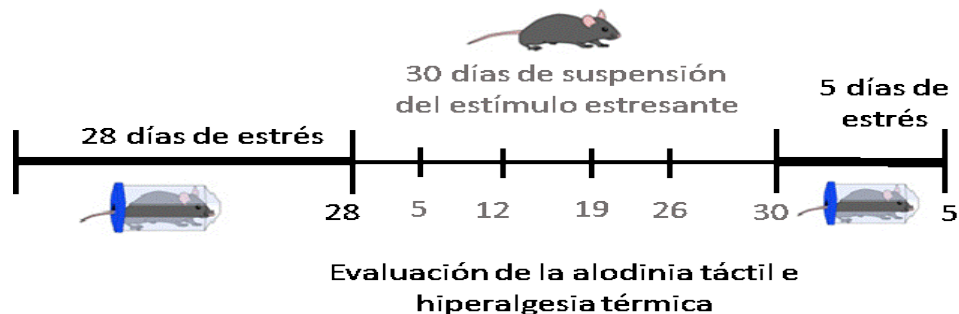


Figura 10. Diseño experimental de la evaluación conductual del efecto del *priming* en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés crónico.

8.3 Diseño farmacológico

Con la finalidad de determinar la participación de KCC2 en las conductas nociceptivas, los animales *naïve* recibieron la inyección intratecal del vehículo (DMSO 20 y 70%) o dosis crecientes del DIOA (0.02, 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{rata}$) y VU0463271 (0.02, 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{rata}$), los bloqueadores de KCC2. La alodinia táctil se evaluó durante 8 horas (**Figura 11**). Se utilizaron grupos independientes ($n=6$) para cada dosis evaluada.

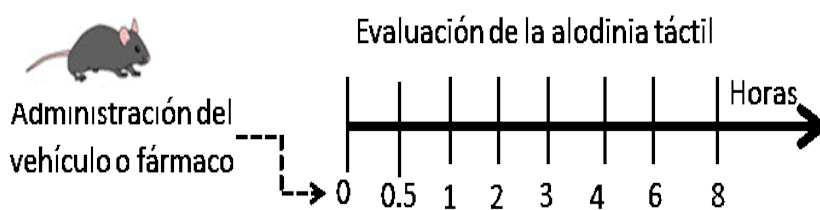


Figura 11. Diseño experimental de la evaluación del efecto alodínico de los inhibidores de KCC2 en ratas *naïve*.

Para determinar el papel funcional de KCC2 en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés, los animales estresados durante 28 días recibieron la inyección intratecal del vehículo DMSO (100%) o dosis crecientes (100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{rata}$) del CLP 257, activador selectivo de KCC2. El efecto antialodínico se evaluó durante 8 horas (**Figura 12**). La administración se realizó 24 horas después de la última sesión de estrés. Se utilizaron grupos independientes ($n=6$) para cada condición experimental.

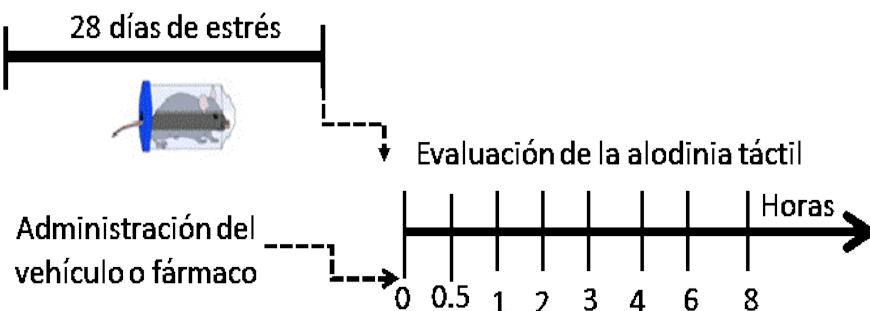


Figura 12. Diseño experimental de la evaluación del efecto antialodínico de CLP 257 en ratas con hipersensibilidad al dolor inducida por estrés crónico.

Para determinar la participación de la microglía en la alodinia táctil inducida por estrés, a partir del día 23 y hasta el día 27 después del inicio del estrés, los animales recibieron una inyección intratecal diaria del vehículo DMSO (20%) o 100 $\mu\text{g}/\text{rata}$ del inhibidor de la microglía, minociclina. La evaluación de la alodinia táctil se realizó cada 24 h a partir del día 23. Los animales se estresaron hasta cumplir 28 días de estrés (**Figura 13**). Se utilizaron grupos independientes ($n=6$) para cada condición experimental.



Figura 13. Diseño experimental de la evaluación del efecto del tratamiento i.t. de minociclina en ratas con hipersensibilidad inducida por estrés crónico.

8.4 Estudio molecular

8.4.1 Cuantificación de BDNF

Se obtuvo la médula espinal lumbar de ratas *naïve* y estresadas a diferentes tiempos (7, 14, 21, 28 días) 24 horas posteriores a la última sesión de estrés. Los

tejidos se procesaron utilizando la técnica de ELISA (**Figura 14**). Se utilizaron grupos independientes (n=3) para cada condición experimental.

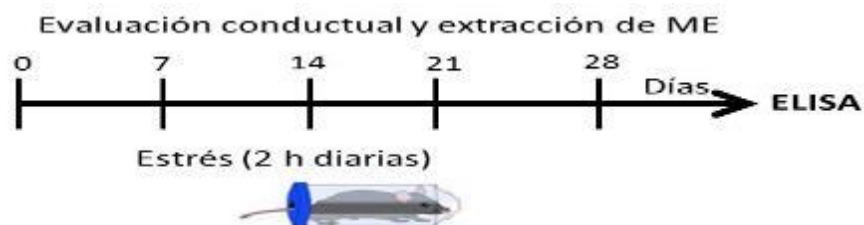


Figura 14. Diseño experimental de la extracción de médula espinal para el ELISA. Los días marcados representan los tiempos en que se obtuvo la médula espinal (ME).

8.4.2 Determinación de la expresión del co-transportador KCC2 total y KCC2 fosforilado por *western blot*

Se obtuvo la médula espinal lumbar y los GRD L4-L6 de cuatro grupos diferentes de ratas. El primer grupo fue de ratas intactas, el segundo grupo fue de ratas estresadas a diferentes tiempos (3, 7, 14, 21, 28 días), el grupo 3 fue de ratas a las que se les suspendió 30 días el estrés crónico y el último grupo fue de ratas que se reexpusieron a 5 días de estrés después del periodo de suspensión del estrés (**Figura 15**). Los tejidos se obtuvieron 24 horas después de la última sesión de estrés y se procesaron utilizando la técnica de *Western Blot*. Se utilizaron grupos independientes (n=3) para cada condición experimental.

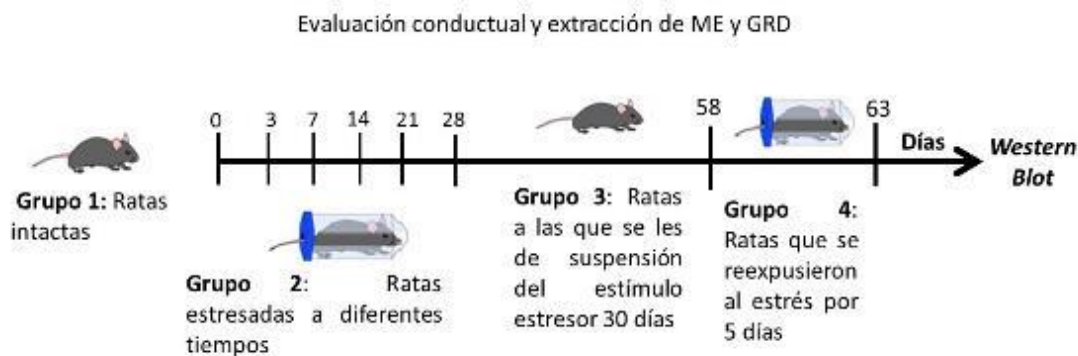


Figura 15. Diseño experimental de la extracción de médula espinal y ganglios de la raíz dorsal para el *Western Blot*.

9 RESULTADOS

9.1 El estrés crónico produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica en ratas

El estrés crónico por restricción de movimiento disminuyó el umbral y la latencia de retiro de la pata de la rata; lo que se interpretó como alodinia táctil (**Figura 16 A**) e hiperalgesia térmica, respectivamente (**Figura 16 C**). Estas conductas nociceptivas se observaron en ambas patas traseras y el efecto máximo efecto de alodinia e hiperalgesia se observo en los días 21 y 28. Las gráficas de ABC (obtenidos a partir de los cursos temporales del 50% del umbral de retiro de la pata de la rata) mostraron que esta disminución fue del 45% en la alodinia y 40% en la hiperalgesia. El análisis estadístico mostró que estas diferencias son significativas entre los grupos de estrés y *naïve*, en ambas patas posteriores (**Figura 16 B/D**).

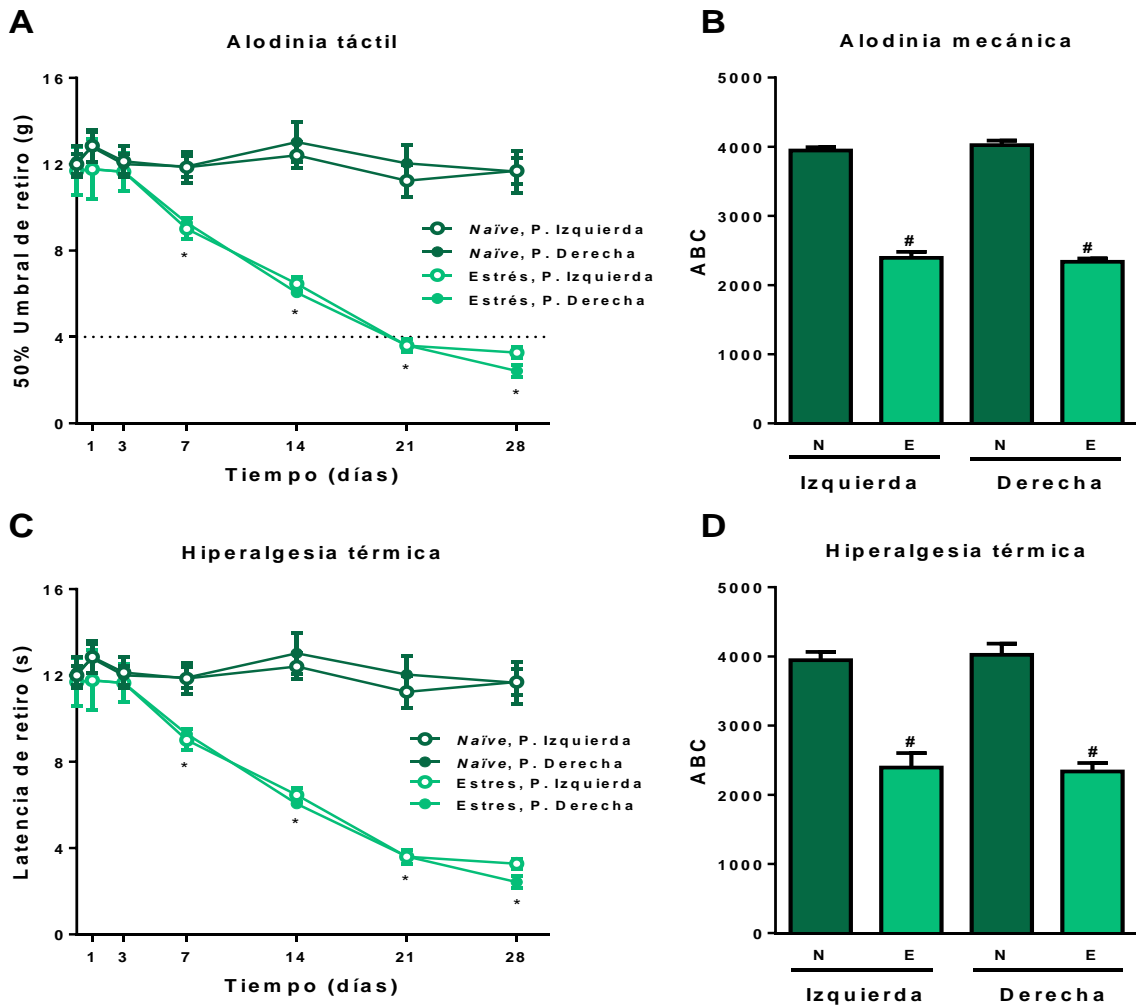


Figura 16. El estrés crónico produjo alodinia táctil e hiperalgnesia térmica. Curso temporal del 50% del umbral de retiro (A) y de la latencia de retiro (C) de las patas posteriores de ratas *naïve* (N) y estresadas (E). B) y D) Área bajo la curva (ABC) del curso temporal de (A) y (C). Los datos se presentan como la media (n=6) ± EEM. * p<0.05, *versus* grupo *naïve*, por ANOVA de dos vías/Tukey (A y C) y # p<0.05 por t de *Student* (B y D).

9.2 El estrés crónico produjo *priming*

Con la finalidad de evaluar si el estrés crónico es capaz de provocar el efecto *priming*, permitimos que los animales se recuperaran de la hipersensibilidad inducida por la aplicación de un primer estímulo nocivo (28 días de estrés). La recuperación duró 30 días. Después de este tiempo, los animales se expusieron a 5 días de estrés. Previamente habíamos observado que cinco días de estrés no produce alodinia táctil (**Figura 16 A**), indicando que este estímulo es subumbral en animales normales. Nuestros resultados mostraron que la hipersensibilidad nociceptiva inducida estrés crónico, se mantuvo durante 12 días después de suspender el estrés (**Figura 17**), y que 30 días después de suspender el estímulo estresor, cuando los umbrales de alodinia táctil e hiperalgia térmica regresaron a valores basales, la exposición al estímulo subumbral (5 días) produjo alodinia táctil e hiperalgia térmica de la misma magnitud que la observada en el día 28 (**Figura 17**).

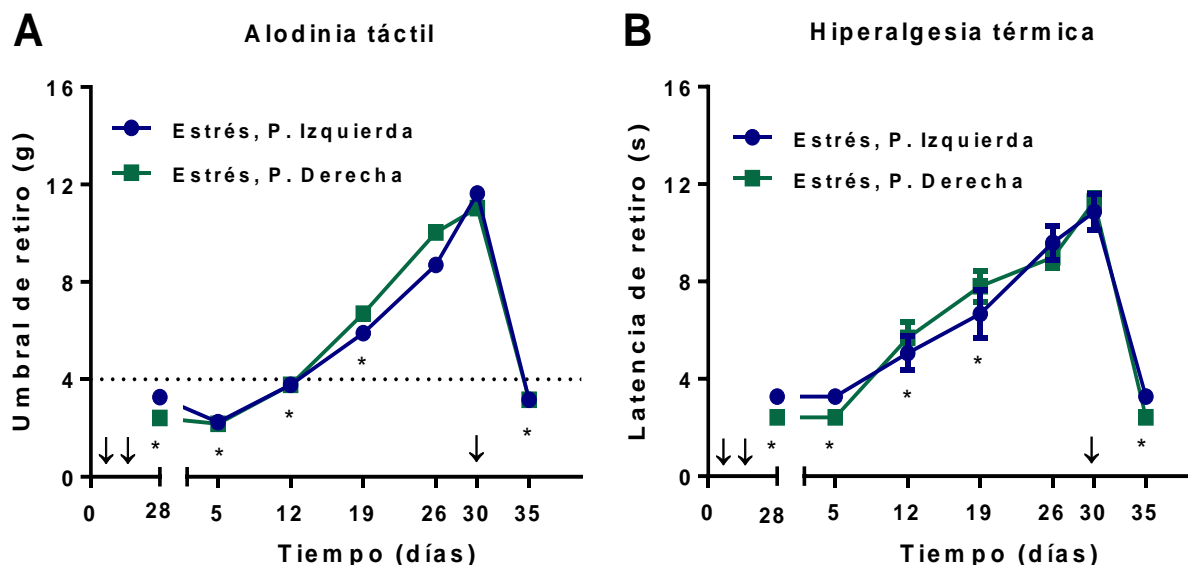


Figura 17. El estrés crónico produjo *priming*. Animales estresados por 28 días se les suspendió el estímulo estresor durante 30 días, posteriormente se reexpusieron al estímulo estresor por 5 días. Curso temporal del 50% del umbral de retiro (g) (**A**) y de la latencia de retiro (s) (**B**) de las patas posteriores de la rata. ↓↓ periodo de estrés crónico (28 días) y ↓ primer día de la reexposición al estímulo estresor. Los datos se presentan como la media (n=6) ± EEM. * p<0.05, *versus* el día 30 de suspensión del estímulo estresor, por ANOVA de dos vías/Tukey.

9.3 Estudio farmacológico

9.3.1 La administración intratecal de DIOA y VU0463271 produjo alodinia táctil en ratas *naïve*

Dado que se ha reportado que el KCC2 participa en la modulación de la información nociceptiva, hipotetizamos que el bloqueo farmacológico de KCC2 produciría alodinia táctil en animales *naïve*. En apoyo a esta idea, la administración intratecal de DIOA o VU0463271 (bloqueadores de KCC2) produjo alodinia táctil de manera transitoria en ratas *naïve* (**Figura 18 A/C**). Este efecto se mantuvo durante las primeras cuatro horas posteriores a la administración de 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{rata}$ de los bloqueadores, mientras que con la dosis de 0.02 $\mu\text{g}/\text{rata}$ se observó un efecto menor. El efecto alodínico de DIOA y VU0463271 resultó dependiente de la dosis (**Figura 18 B/D**). Por otro lado, la inyección intratecal del vehículo (DMSO 70%) provocó una ligera disminución en el umbral de retiro de la pata durante las primeras dos horas.

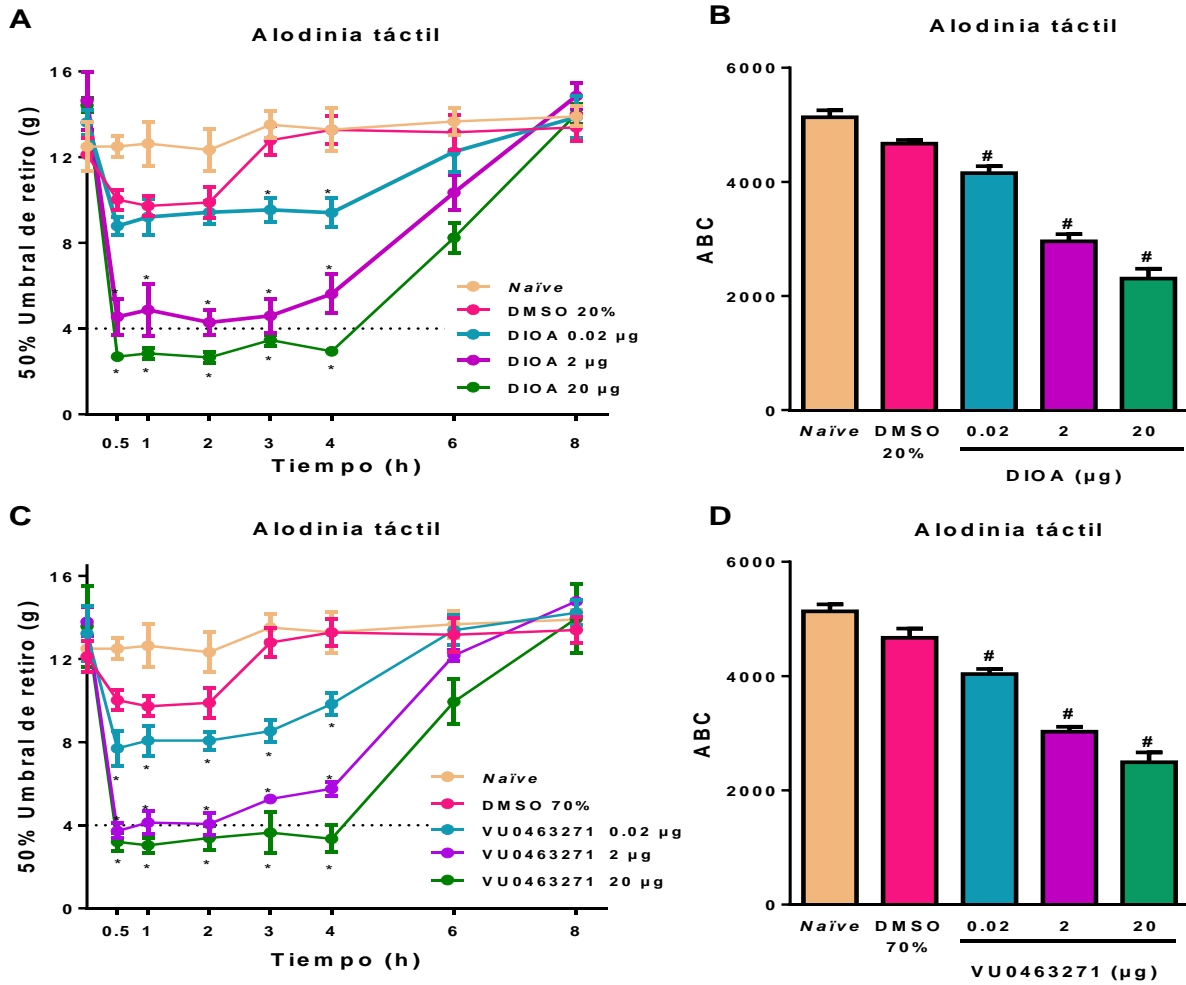


Figura 18. El bloqueo farmacológico del co-transportador KCC2 produjo alodinia táctil en ratas intactas. Efecto de la administración de DIOA o VU0463271 (0.02-20 µg/rata) por vía i.t. a ratas naïve. Curso temporal del efecto alodínico tras la administración de **A)** DIOA y **C)** VU0463271. **B)** y **D)** Área bajo la curva (ABC) del curso temporal de (A) y (C). Los datos se presentan como la media (n=6) ± EEM. * p<0.05, versus grupo DMSO, por ANOVA de dos vías/Dunnett (A y C) y # p<0.05, por ANOVA de una vía/Dunnett (B y D).

9.3.2 La administración de CLP 257 redujo la alodinia en ratas con estrés crónico

Debido a que el bloqueo del co-transportador KCC2 tuvo efecto alodínico en ratas *naïve*, se propuso que la administración de un activador de KCC2 reduciría la alodinia en animales estresados. Nuestros resultados mostraron que la administración intratecal del activador del co-transportador KCC2 (CLP 257) en ratas estresadas (día 28) aumentó el umbral de retiro; lo que se interpretó como efecto antialodínico. Las dosis de 200 y 300 $\mu\text{g/rata}$ de CLP 257 revirtieron parcialmente la alodinia táctil inducida por estrés durante las primeras cuatro horas. En contraste, la dosis de 100 $\mu\text{g/rata}$ de CLP 257 produjo un efecto antialodínico menor y de menor duración (**Figura 19 A**). En la **figura 19 B** se muestra que el CLP 257 produjo un efecto antialodínico dependiente de la dosis. En contraste, la inyección intratecal del vehículo (DMSO 100%) no modificó el umbral de retiro de la pata.

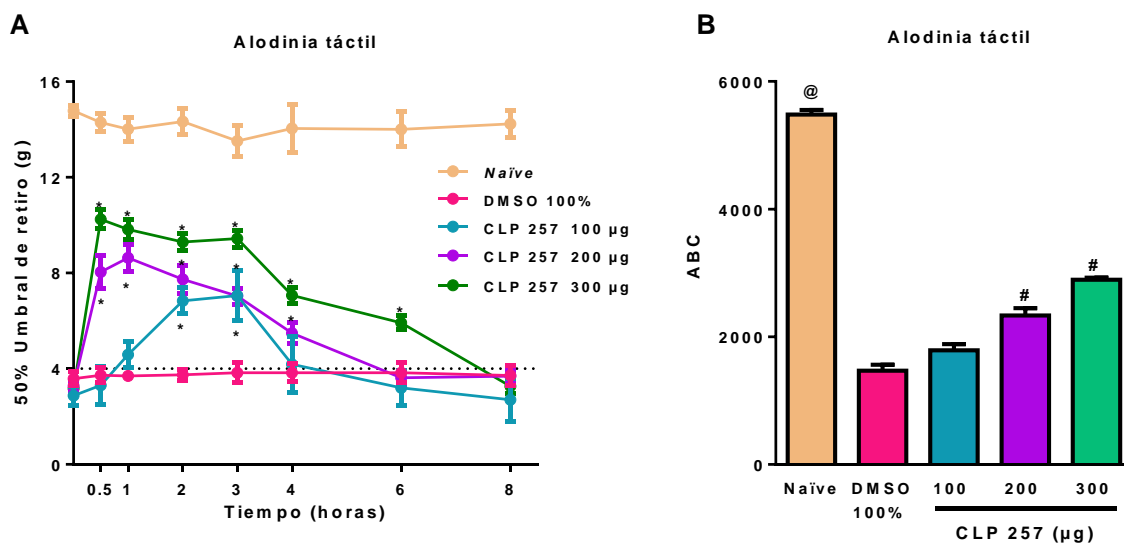


Figura 19. Efecto antialodínico del CLP 257 en ratas con hipersensibilidad inducida por estrés crónico. Efecto de la administración de CLP 257 (100-300 $\mu\text{g/rata}$) por vía i.t. a ratas estresadas por 28 días. **A)** Curso temporal del efecto antialodínico de CLP 257. **B)** Área bajo la curva (ABC) del curso temporal (A). Los datos se presentan como la media ($n=6$) \pm EEM. * $p<0.05$, versus el grupo DMSO, por ANOVA de dos vías/Dunnett (A), # $p<0.05$, versus DMSO, por ANOVA de una vía/Dunnett y @ $p<0.05$, versus CLP 257, por ANOVA de una vía/Dunnett (B).

9.3.3 La administración subcrónica de minociclina redujo la alodinia en ratas con estrés crónico

Debido a que existen reportes de que la microglía activada libera al BDNF y esto conduce a la disminución de la expresión del co-transportador KCC2 (Coull *et al.*, 2005) y a que nuestros resultados sugieren que el KCC2 participa en la hipersensibilidad inducida por estrés, hipotetizamos que la administración de un inhibidor de la microglía tendría un efecto antialodínico en ratas estresadas. Observamos que el tratamiento durante 5 días con el inhibidor de la microglía, minociclina (100 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{i.t.}$), pero no del vehículo, revirtió parcialmente la alodinia táctil inducida por estrés. El efecto máximo se observó posterior a la tercera administración y se mantuvo por al menos 24 horas después de ésta (**Figura 20 A**). En el grafico del área bajo la curva, observamos que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) (**Figura 20 B**).

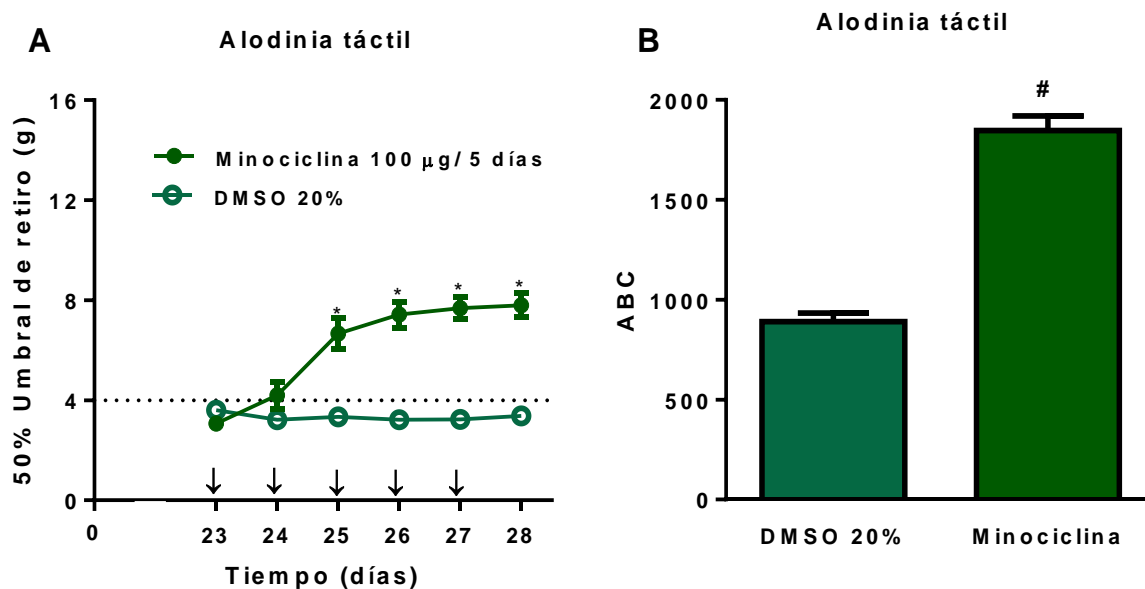


Figura 20. Efecto antialodínico de minociclina en ratas con hipersensibilidad inducida por estrés crónico. Efecto de la administración de minociclina (100 $\mu\text{g}/\text{rata}/5$ días) por vía i.t. a ratas estresadas. **A)** Curso temporal del efecto antialodínico de minociclina. Las flechas indican la inyección de minociclina. **B)** Área bajo la curva (ABC) del curso temporal (A). Los datos se presentan como la media ($n=6$) \pm EEM. * $p < 0.05$, versus el grupo DMSO, por ANOVA de dos vías/Dunnett (A) y # $p < 0.05$ por t de Student (B).

9.4 Estudio molecular

9.4.1 El estrés crónico aumentó las concentraciones de BDNF en la médula espinal

Se sabe que el BDNF liberado de la microglía activada disminuye la expresión de KCC2 (Coull *et al.*, 2005). Con base en esto, decidimos evaluar los niveles de BDNF debido a que nuestros datos farmacológicos sugieren que el KCC2 y la microglía participan en la hipersensibilidad inducida por estrés crónico. Nuestros resultados mostraron que el estrés crónico aumentó las concentraciones tisulares de BDNF en la porción dorsal de la médula espinal de ratas estresadas en los días 21 y 28 (* $p < 0.05$) (Figura 21).

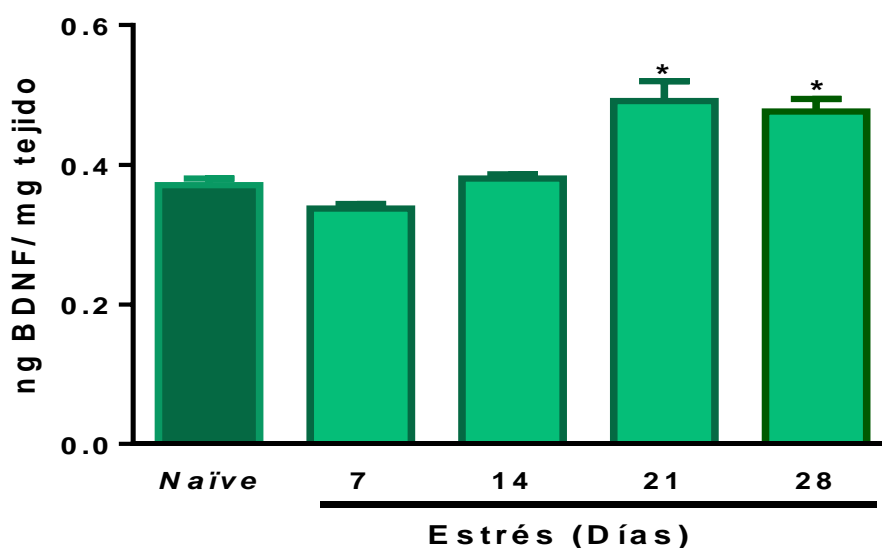


Figura 21. El estrés crónico aumentó las concentraciones tisulares de BDNF. Determinación de las concentraciones tisulares de BDNF en la parte dorsal lumbar de la médula espinal de ratas naïve y estresadas a diferentes tiempos (7, 14, 21 y 28 días). Los datos se presentan como la media \pm EEM de las concentraciones de BDNF (ng) por mg de tejido de 3 ratas independientes para cada grupo experimental. * $p < 0.05$, versus el grupo naïve, por ANOVA de una vía/Dunnett.

9.4.2 El estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la médula espinal

Decidimos evaluar la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado debido a que observamos que 1) el KCC2 participa en la alodinia inducida por estrés, 2) que las concentraciones de BDNF están aumentadas en ratas estresadas y 3) que la fosforilación de KCC2 en la Serina 940 favorece su expresión en la membrana celular (Lee *et al.*, 2007). Nuestros resultados muestran que la proteína de KCC2 se expresó en la parte dorsal de la médula espinal de ratas *naïve* y está ausente en ganglios de la raíz dorsal L4-L6 (**Figura 22 B**). Además, el estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la porción dorsal de la médula espinal 7-28 días después del inicio del estímulo estresor (**Figura 22 A y 23 A**). La proporción de la densidad óptica de KCC2 fosforilado en relación con la expresión de KCC2 total se redujo aproximadamente un 60% después de 14-28 días de estrés, lo que nos indica que el estrés disminuye la expresión de KCC2 membranar (**Figura 23 B**). También observamos que cuando los animales se recuperaron de la hipersensibilidad (30 días después de suspender el estrés), la expresión de KCC2 se restaura y la reexposición a cinco días de estrés (cuando se presentaron las conductas nociceptivas) es suficiente para disminuir de nuevo la expresión de KCC2 (**Figura 22 A**).

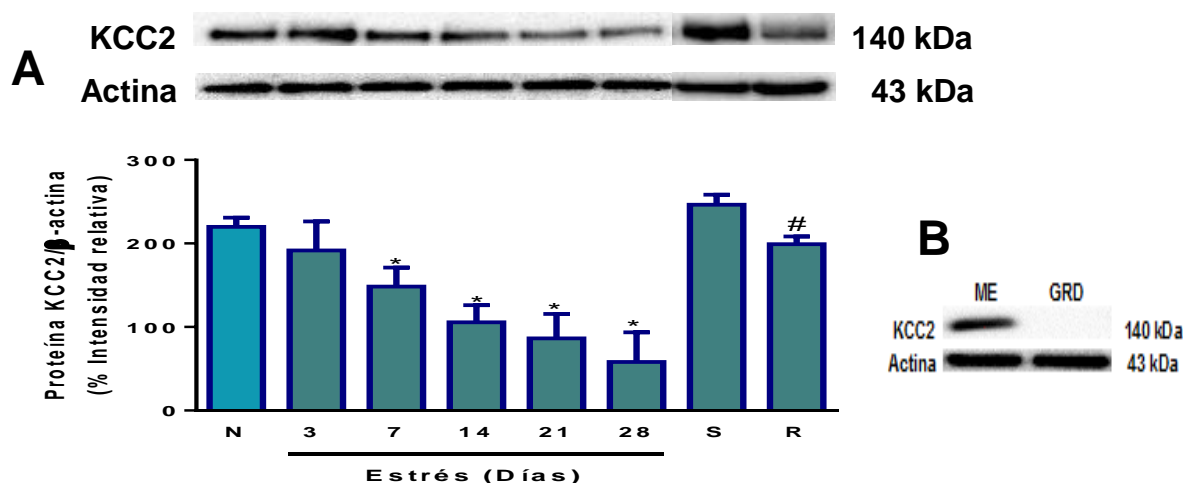


Figura 22. El estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 total en la médula espinal. (A) Expresión de la proteína de KCC2 en la parte dorsal lumbar de la médula espinal de ratas *naïve* (N) y estresadas (3, 7, 14, 21 y 28 días), ratas con suspensión del estrés (30 días) (S) y ratas con reexposición al estrés (5 días) (R). **(B)** El KCC2 no se expresó en ganglio de la raíz dorsal (GRD) de ratas *naïve*, comparado con la médula espinal (ME). Los datos se presentan como la media \pm EEM del porcentaje de intensidad relativa normalizado contra β -actina de 3 ratas independientes para cada grupo experimental. * $p < 0.05$, versus el grupo *naïve*, por ANOVA de una vía/Dunnett, # $p < 0.05$ versus grupo S, por t de Student.

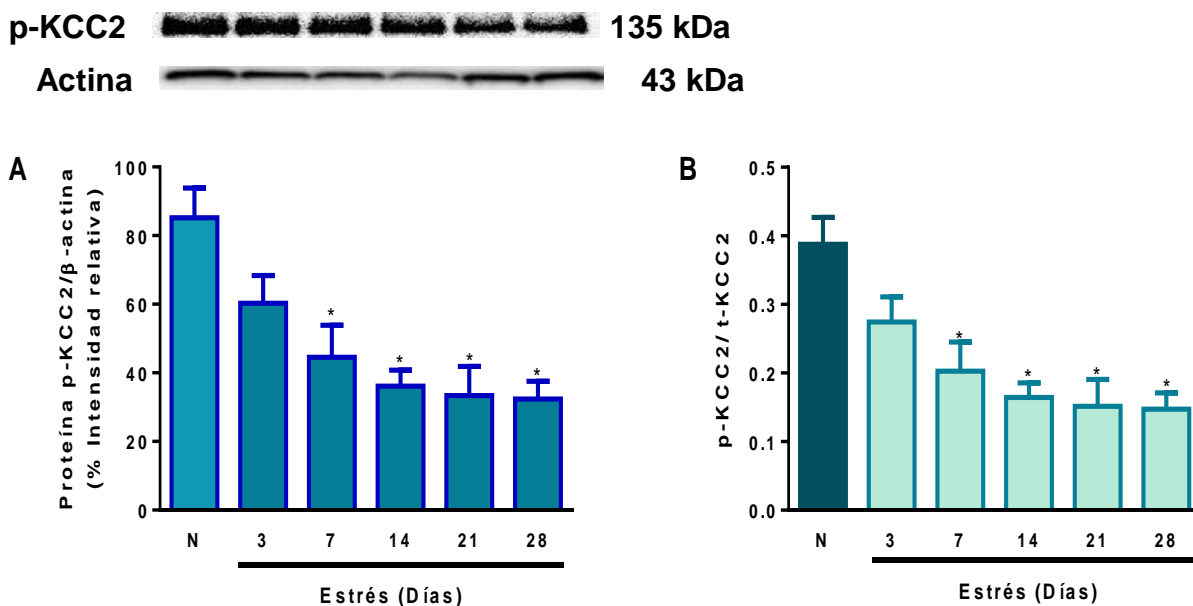


Figura 23. El estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 fosforilado en la médula espinal. (A) Expresión de la proteína de KCC2 fosforilado en la parte dorsal lumbar de la médula espinal de ratas *naïve* y estresadas (3, 7, 14, 21 y 28 días). **(B)** Proporción de la densidad óptica de KCC2 fosforilado en relación con la expresión de KCC2 total. Los datos se presentan como la media \pm EEM del porcentaje de intensidad relativa normalizado contra β -actina de 3 ratas independientes para cada grupo experimental. * $p < 0.05$, versus el grupo *naïve* (N), por ANOVA de una vía/Dunnett.

10 DISCUSIÓN

10.1 El estrés crónico produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica

El presente trabajo corrobora que el estrés crónico por restricción de movimiento produce alodinia táctil e hiperalgesia térmica en ambas patas de la rata. Estos datos sugieren que el estrés crónico induce hipersensibilidad nociceptiva generalizada. En apoyo a nuestro estudio, se ha reportado que el mismo estímulo estresor produce hipersensibilidad nociceptiva (Gamaro *et al.*, 1995; da Silva *et al.*, 2003; Imbe *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Gameiro *et al.*, 2005, 2006; Bardin *et al.*, 2009; Spezia *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo utilizando el mismo protocolo de estrés demostraron que el desarrollo de las conductas nociceptivas es independiente del sexo de la rata (Velazquez-Lagunas 2017). En contraste, Gamaro *et al.* (1998) reportaron que el estrés crónico por restricción de movimiento no genera hiperalgesia térmica en ratas hembra. Esta discrepancia podría deberse a la técnica empleada para evaluar la hipersensibilidad (plancha caliente *versus* retiro de la cola) y al protocolo de estrés utilizado (2h al día durante 4 semanas *versus* 1h al día por 4 semanas).

Por otro lado, nuestros datos de hipersensibilidad inducida por estrés son similares a lo reportado por diversos autores utilizando otros agentes estresores como nado forzado, exposición a temperaturas frías, evitación al agua, derrota social y exposición continua a aire (Fereidoni *et al.*, 2007; Suarez-Roca *et al.*, 2008; Fujisawa *et al.*, 2008; Bardin *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Rivat *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2013; Tramullas *et al.*, 2015).

A la fecha se desconoce el mecanismo exacto por el cual el estrés crónico induce hipersensibilidad. Sin embargo, se sabe que la activación persistente de la respuesta al estrés aumenta los niveles de catecolaminas, corticosterona y mediadores proinflamatorios (Gameiro *et al.*, 2005; Sorrells *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Hartung *et al.*, 2014; Guevara *et al.*, 2015). Estos mediadores activan a sus respectivos receptores localizados en las fibras aferentes primarias y/o en neuronas de proyección y producen conductas nociceptivas (Hartung *et al.*, 2014; Shaqura *et*

al., 2016; Ciszek *et al.*, 2016). Además, el estrés crónico activa tanto a la microglía como a los astrocitos (Yasui *et al.*, 2014; Koyanagi *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017). Esto promueve la síntesis y secreción de diversas citocinas las cuales activan a sus respectivos receptores localizados en las neuronas sensoriales favoreciendo la hiperexcitabilidad neuronal (Kawanishe *et al.*, 1997; Simard *et al.*, 1999; Bardin *et al.*, 2009; Koyanagi *et al.*, 2016). Igualmente, el estrés crónico aumenta los niveles de glutamato (Lian *et al.*, 2017). Con base en estos antecedentes y en los hallazgos de este proyecto se sustenta el hecho de que el estrés crónico por restricción de movimiento bajo estas condiciones ejerce un efecto pronociceptivo.

10.2 El estrés crónico produjo *priming*

Nuestros resultados mostraron que la aplicación de un estímulo subumbral (cinco días de estrés) produce alodinia táctil e hiperalgesia térmica en los animales que se recuperaron de la hipersensibilidad inducida por la exposición a 28 días de estrés. Estos datos sugieren que el estrés crónico produce *priming*. Con respecto a esto, se ha reportado que el estrés por evitación al agua (Álvarez *et al.*, 2014) o exposición a ruido (Khasar *et al.*, 2008) produce *priming* tras la administración de prostaglandina E₂ (PGE₂). De igual forma, se ha reportado que otros estímulos nocivos como el NGF, GDNF, IL-6 y carragenina producen *priming* (Aley *et al.*, 2000; Parada *et al.*, 2003; Dina *et al.*, 2009; Burgos *et al.*, 2016). Estos estudios permiten sugerir que el *priming* inducido por estrés se debe a una “memoria” al dolor o sensibilización central. Se ha propuesto que los mecanismos que subyacen a la inducción del *priming* están mediados principalmente por alteraciones celulares en las neuronas de primer y segundo orden (Price y Inyang, 2015). Por ejemplo, en el *priming* hay cambios transcripcionales que modifican el fenotipo neuronal (Melemedijan *et al.*, 2014), se activan proteínas que favorecen la síntesis proteica (Price y Geranton, 2009; Melemedijan *et al.*, 2010) y se favorece la activación de cinasas que fosforilan múltiples proteínas (Sacktor, 2011; Burgos-Vega *et al.*, 2016). Todo esto favorece la excitabilidad neuronal para responder a un estímulo posterior más rápido.

De manera interesante, la expresión de KCC2 se restauró cuando los animales se recuperaron de la hipersensibilidad. Además, la reexposición a cinco días de estrés, cuando las conductas nociceptivas se presentaron de nuevo, fue suficiente para disminuir la expresión de KCC2. Estos datos sugieren que el estrés modula la expresión de KCC2 y este co-transportador participa en el *priming* inducido por estrés. En apoyo a esto, existe evidencia que demuestra que el cambio en el acoplamiento de los receptores acoplados a proteínas G (de Gq a Gi) (Khasar *et al.*, 2008) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (Álvarez *et al.*, 2014) en las fibras aferentes primarias participan en el *priming* inducido por estrés.

La explicación más sencilla sobre la participación de KCC2 en el *priming* podría ser que la reexposición a cinco días de estrés promueve la liberación de BDNF de la microglía y esto a su vez regula a la baja la expresión de KCC2. De acuerdo con esto, se ha reportado que el estrés es capaz de sensibilizar a la microglía para responder de manera más eficiente a estímulos posteriores (Frank *et al.*, 2012, 2014) y que el BDNF participa en el *priming* inducido por la administración de IL-6 (Burgos *et al.*, 2016). También, se sabe que las fibras aferentes primarias sufren alteraciones que las hace más excitables en el *priming* (Price y Inyang, 2015). Esto puede desencadenar la liberación de diversos mediadores en la médula espinal que favorecen la activación de la microglía, astrocitos y neuronas de proyección lo que facilitaría la conducción de la información nociceptiva.

El *priming* nos podría ayudar a entender los síndromes de dolor generalizados que se presentan en ausencia de daño estructural o inflamación. Se podría sugerir que el *priming* inducido por estrés es un mecanismo que subyace a los síndromes de dolor funcional. De acuerdo con esto, la evidencia clínica demuestra que el estrés exagera la hipersensibilidad de patologías como la fibromialgia y el síndrome del colon irritable, entre otros (Van Houdenhove y Luyten, 2006; Egle y van Houdenhove, 2006; Grande *et al.*, 2004). Además, los pacientes con dolor funcional informan haber estado expuestos a un evento traumático previo a la aparición del dolor crónico (Staud, 2004; Walker *et al.*, 2012).

10.3 La administración intratecal de DIOA y VU0463271 produjo alodinia táctil en ratas *naïve*

La administración de dos bloqueadores de KCC2 (DIOA y VU0463271) indujo conductas nociceptivas evocadas en animales *naïve*. Estos datos sugieren que el KCC2 participa en el procesamiento de estímulos dolorosos. En apoyo a esto, hay evidencia que el bloqueo de KCC2 mediante la administración del DIOA o la furosemida induce conductas nociceptivas en animales intactos (Zhang *et al.*, 2008; Jolivalt *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). También, la administración de un oligodesoxinucleótido antisentido disminuye la expresión de KCC2 espinal y tiene un efecto pronociceptivo (Coull *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009). A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que evalúa el efecto de VU0463271 en la nocicepción.

El KCC2 es esencial para mantener niveles intracelulares de Cl⁻ bajos con respecto a la parte extracelular y para la función hiperpolarizante del receptor GABA_A en las neuronas del SNC (Price *et al.*, 2008). Estudios previos mostraron que el bloqueo de KCC2 está asociado con la pérdida de los mecanismos inhibidores postsinápticos. En apoyo con lo anterior, se ha reportado que el DIOA y la furosemida aumentan los niveles intracelulares de Cl⁻ y causan despolarización mediada por GABA en cultivo de neuronas espinales de animales intactos (Boulenguez *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2015; Ferrini *et al.*, 2013). De igual forma, la aplicación del DIOA disminuye los potenciales postsinápticos inhibitorios (Tang *et al.*, 2015) y aumenta la frecuencia de los potenciales de acción (Boulenguez *et al.*, 2010) de las neuronas espinales. Tomados juntos, los datos sugieren que el bloqueo de KCC2 espinal altera los mecanismos inhibidores y esto es suficiente para permitir que estímulos inocuos tengan acceso a vías nociceptivas y de esta manera produzcan hipersensibilidad en animales intactos.

10.4 La administración de CLP 257 redujo la alodinia en ratas con estrés crónico

La administración del activador de KCC2 (CLP 257) redujo las conductas nociceptivas en ratas estresadas. Estos datos sugieren que el KCC2 participa en la hipersensibilidad inducida por estrés. Este dato es consistente con estudios que reportan que la administración del CLP 257 tiene efecto antinociceptivo en animales con dolor neuropático (Gagnon *et al.*, 2013; Lavertu *et al.*, 2014) e hiperalgesia inducida por morfina (Ferrini *et al.*, 2017).

La alteración de la actividad de KCC2 está asociada con la disrupción en la homeostasis del Cl⁻ y por consiguiente la desinhibición post-sináptica en condiciones de dolor (Coull *et al.*, 2003; Ferrini *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). Se ha sugerido que restaurar la actividad de KCC2 espinal mediante la administración del CLP 257 restablece la homeostasis del Cl⁻ en cultivo de neuronas espinales de animales con dolor neuropático (Gagnon *et al.*, 2013) y dolor inducido por morfina (Ferrini *et al.*, 2017). También se observó que restaurar la expresión de KCC2 mediante la administración de un vector viral tiene un efecto antialodínico y restablece la homeostasis del Cl⁻ en ratas con dolor neuropático (Li *et al.*, 2016).

La participación de KCC2 en dolor inflamatorio y neuropático es clara. Por ejemplo, Coull *et al.* (2003) fueron los primeros en demostrar la participación de KCC2 en un modelo de dolor neuropático. Posteriormente, se demostró que el KCC2 participa en el dolor inflamatorio (Nomura *et al.*, 2006) y dolor inducido por morfina (Ferrini *et al.*, 2013). De manera sobresaliente, nosotros observamos que el KCC2 participa en la alodinia táctil en un modelo de dolor funcional. En concordancia con nuestro resultado, Tang *et al.* (2015) observaron que el KCC2 participa en la hipersensibilidad visceral inducida por estrés mediante evitación al agua durante 10 días. Nuestros resultados extienden dichos datos al sugerir la participación de KCC2 en el dolor somático inducido por estrés. En conjunto, esto sugiere que alterar la actividad de KCC2 genera hipersensibilidad sin importar la causa que lo origina y por lo tanto tiene un papel importante en los mecanismos implicados en la señalización nociceptiva.

Nuestros resultados mostraron que la administración del activador de KCC2 disminuyó las conductas nociceptivas. Sin embargo, la inyección de este fármaco no fue suficiente para restaurar los umbrales de dolor a valores de los animales *naïve*. Esto puede deberse a que existen otros mecanismos que participan de manera importante en la generación de las conductas nociceptivas inducidas por el estrés.

10.5 La administración subcrónica de minociclina redujo la alodinia en ratas con estrés crónico

El tratamiento repetido con el inhibidor de la microglía (minociclina) revirtió parcialmente la alodinia táctil inducida por estrés. Nuestro trabajo concuerda con reportes previos que demuestran que la administración de minociclina previene (Bradesi *et al.*, 2009; Suarez-Roca *et al.*, 2014) y revierte (Yasui *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017) las conductas nociceptivas inducidas por varios tipos de estrés. En conjunto, ésto demuestra que la microglía participa parcialmente en la hipersensibilidad inducida por estrés. En apoyo a esta idea, se ha reportado que el tratamiento con minociclina también revierte las conductas nociceptivas en modelos de dolor neuropático (Raghavendra *et al.*, 2003; Barragán-Iglesia *et al.*, 2014) e inflamatorio (Cho *et al.*, 2006; Mert *et al.*, 2018).

Nuestros resultados implican que el estrés crónico activa a la microglía. Se ha demostrado que los glucocorticoides liberados durante el estrés activan directamente a la microglía (Frank *et al.*, 2012, 2014) o de manera indirecta mediante la estimulación de los astrocitos (Koyanagi *et al.*, 2015) o fibras aferentes primarias (Suter *et al.*, 2007). La microglía activada libera diversas moléculas, una de ellas es el BDNF (Beggs y Salter, 2010, 2013). El BDNF promueve la hipersensibilidad de las neuronas del asta dorsal (Shu *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Heppenstall y Lewin, 2001). Se ha demostrado que el BDNF liberado de la microglía participa en la generación de las conductas nociceptivas en modelos de dolor (Coull *et al.*, 2005; Ulmann *et al.*, 2008; Ferrini *et al.*, 2013). Asimismo, los ratones carentes de BDNF específico de la microglía no desarrollan alodinia después de la lesión de nervios espinales (Sorge *et al.*, 2015). Todo esto sugiere que la activación de la

microglía es esencial para la hipersensibilidad al dolor y cualquier tratamiento que interrumpa el funcionamiento glial puede prevenir y/o revertir parcialmente el comportamiento del dolor en roedores.

Evidencia reciente muestra que la microglía participa en la hiperalgesia únicamente en ratones machos, pero no en hembras, lo que sugiere que el papel de la microglía es dependiente del sexo del animal (Sorge *et al.*, 2015; Taves *et al.*, 2016). Nuestros datos se realizaron en ratas hembra, por lo que la discrepancia en los resultados podría deberse al modelo de dolor (estrés *versus* lesión nervios espinales), a la especie (rata *versus* ratón) y cepa (Wistar *versus* C57BL/6J) utilizada.

Con base en nuestros resultados, no podemos descartar la posibilidad de que otras alteraciones estén implicadas en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés, ya que el tratamiento con minociclina no suprimió por completo la alodinia en el presente estudio.

10.6 El estrés crónico aumentó las concentraciones de BDNF en la médula espinal

El estrés crónico aumentó significativamente las concentraciones tisulares de BDNF en la porción dorsal de la médula espinal de ratas estresadas durante 21-28 días. Este aumento correlaciona con las conductas nociceptivas observadas en los animales sometidos a 21 y 28 días de estrés y con el efecto antinociceptivo observado por la administración del inhibidor de la microglía. Nuestros resultados son los primeros en demostrar que el estrés crónico por restricción de movimiento aumenta el contenido tisular de BDNF. Sin embargo, se ha reportado que el estrés aumenta la expresión de BDNF en la médula espinal y esto correlaciona con la hipersensibilidad visceral (Winston *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2018). También se ha reportado que la exposición a estímulos estresantes incrementa la expresión del gen de BDNF en la PAG (Norman *et al.*, 2010) y la proteína de BDNF en hipocampo, núcleo estriado, amígdala, área tegmental ventral y corteza prefrontal (Bland *et al.*, 2005; Greisen *et al.*, 2005; Aguilar-Valles *et al.*, 2005; Schutle-Herbruggen *et al.*, 2006; Shi *et al.* 2010). Todos estos resultados nos permiten sugerir que 1) el estrés

DISCUSIÓN

modula la expresión de BDNF y 2) el aumento de esta neurotrofina participa en la hipersensibilidad inducida por estrés.

Se sabe que el BDNF tiene un papel pronociceptivo (Pezet *et al.*, 2002; Obata y Noguchi, 2006). La administración intratecal de BDNF produce conductas nociceptivas en animales intactos (Pezet *et al.*, 2002; Merighi *et al.*, 2008). Además, las concentraciones de BDNF en la médula espinal están aumentadas en condiciones de dolor (Geng *et al.*, 2010; Filho *et al.*, 2016; Laste *et al.*, 2015) y los tratamientos que inhiben la interacción de BDNF con su receptor (TrkB) revierten la alodinia táctil inducida por daño a los nervios espinales (Zhou *et al.*, 2000; Yajima *et al.*, 2002, 2005), inflamación (Zhang *et al.*, 2008) o administración repetida de morfina (Ferrini *et al.*, 2013).

Numerosos estudios han demostrado que el KCC2 es el modulador río abajo de la vía BDNF/TrkB. Se ha demostrado que tanto el BDNF como el bloqueo de KCC2 producen un cambio despolarizante mediado por GABA en neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Coull *et al.*, 2003, 2005). Estudios posteriores proporcionan evidencia más directa de que la interacción de BDNF con su receptor TrkB disminuye la expresión de KCC2 y esto conduce a la pérdida de la inhibición GABAérgica en condiciones de dolor (Miletic y Miletic 2008; Zhang *et al.*, 2008, 2013; Ferrini *et al.*, 2013). También, se ha propuesto que el efecto pronociceptivo de BDNF está mediado por el aumento de la transmisión glutamatérgica. La evidencia sugiere que la vía BDNF-TrkB activa a la cinasa Fyn. Esta cinasa fosforila al receptor NMDA e incrementa la excitabilidad glutamatérgica en neuronas espinales (Geng *et al.*, 2010; Hildebrand *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). En conjunto, los datos sugieren que el BDNF produce hipersensibilidad por alteración de los mecanismos inhibidores (mediante el co-transportador KCC2) y favorece la excitabilidad (mediante el receptor NMDA) en neuronas localizadas en el asta dorsal de la médula espinal de ratas estresadas.

10.7 El estrés crónico disminuyó la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la médula espinal

Nuestros resultados mostraron que la proteína de KCC2 se expresa en la parte dorsal de la médula espinal de ratas *naïve* y está ausente en ganglios de la raíz dorsal L4-L6, lo que concuerda con investigaciones previas (Coull *et al.*, 2003). Además, demostramos que el estrés crónico disminuye significativamente la expresión de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la porción dorsal de la médula espinal. La disminución máxima de la expresión de KCC2 se observó en el día 21 y 28 después del estrés. Esto correlaciona con el aumento de BDNF y con las conductas nociceptivas. Estos resultados nos permiten sugerir que 1) el KCC2 está localizado en lugares estratégicos para la modulación de la nocicepción, 2) el estrés crónico disminuye la expresión de KCC2 espinal y esto contribuye al desarrollo y mantenimiento de las conductas nociceptivas y 3) el BDNF disminuye la expresión de KCC2. El único hallazgo previo al presente es un estudio que demostró que el estrés por evitación al agua induce hipersensibilidad visceral y disminuye el ARNm y la proteína de KCC2 en la médula espinal (Tang *et al.*, 2015). Nuestros resultados concuerdan con este trabajo y lo amplían al mostrar que el estrés crónico disminuye la expresión de KCC2 fosforilado y que estos cambios se inician con la activación de la microglía y la liberación de BDNF.

En apoyo a nuestros resultados, existe evidencia que demuestra que el estrés disminuye la expresión de KCC2 total en el PVN del hipotálamo (Hewitt *et al.*, 2009; Miller y Maguire *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2016) y KCC2 fosforilado en hipocampo (Tsukahara *et al.*, 2016) y en PVN del hipotálamo (Sarkar *et al.*, 2011). De la misma manera, varios estudios demuestran que la lesión al nervio disminuye la proteína de KCC2 fosforilado (Mòdol *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016) y KCC2 total (Coull *et al.*, 2003; Cramer *et al.*, 2008; Boulenguez *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2013; Mòdol *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016). La inflamación (Nomura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009) y la administración repetida de morfina (Ferrini *et al.*, 2013) también disminuye la expresión de KCC2 total.

DISCUSIÓN

De manera interesante nuestros datos mostraron que la expresión de KCC2 disminuye a partir del día 7, antes de que los niveles de BDNF aumenten, lo que sugiere que el KCC2 podría estar modulado por otros mecanismos. Se ha reportado que el dolor neuropático activa a la calpaína. Esto promueve la endocitosis y degradación de KCC2 (Zhou *et al.*, 2011). También se ha reportado que las modificaciones epigenéticas regulan al KCC2 en modelos de dolor inflamatorio (Lin *et al.*, 2016) y oncológico (Hou *et al.*, 2018).

En conjunto, nuestros datos permiten sugerir que la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés se debe en parte a la activación de la microglía espinal. La microglía activada libera al BDNF y la unión de BDNF a su receptor TrkB, expresado en neuronas del asta dorsal de la médula espinal, disminuye la expresión de KCC2. Esto aumentaría los niveles intracelulares del Cl⁻ en las neuronas espinales. Esto a su vez conduce al aumento de la excitabilidad de las neuronas de proyección por acción del GABA sobre los receptores GABA_A.

11 CONCLUSIONES

11.1 Conclusiones particulares

- El estrés crónico por restricción de movimiento induce hipersensibilidad nociceptiva en la rata mediada por activación de la microglía y el aumento de los niveles espinales de BDNF.
- El KCC2 participa en el procesamiento de la hipersensibilidad nociceptiva al dolor inducida por estrés crónico en la rata.
- El estrés crónico por restricción de movimiento produce *priming* dependiente de KCC2.
- El estrés crónico por restricción de movimiento aumenta los niveles tisulares de BDNF y reduce la expresión de la proteína de KCC2 total y KCC2 fosforilado en la médula espinal.

11.2 Conclusión general

- Los resultados sugieren que el estrés crónico por restricción de movimiento induce hipersensibilidad nociceptiva mediante la liberación de BDNF y la activación de la microglía, lo que a su vez disminuye la expresión de KCC2 en el asta dorsal de la médula espinal.

12 PERSPECTIVAS

- Evaluar mediante herramientas electrofisiológicas las corrientes de cloruro en neuronas GABAérgicas de la médula espinal en un modelo de dolor funcional.
- Evaluar la participación de la vía microglía-BDNF-TrkB-KCC2-GABA_A en estructuras implicadas en las vías descendentes del dolor como la PAG y la MRV en un modelo de dolor funcional.
- Evaluar la participación de otras vías de señalización que regulen a la baja la expresión de KCC2, como la vía de la calpaína y modificaciones epigenéticas en un modelo de dolor funcional.
- Evaluar los mecanismos moleculares del *priming* inducido por estrés.

13 REFERENCIAS

- Abdelhamid, R., Kovacs, K., Pasley, J., Nunez, M., Larson, A. (2013). Forced swim-induced musculoskeletal hyperalgesia is mediated by CRF2 receptors but not by TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*, 72: 29–37.
- Aguilar-Valles, A., Sanchez, E., de Gortari, P., Balderas, I., Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F. (2005) Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRHR1, glucocorticoid receptors and Brain-Derived Neurotrophic Factor in limbic regions. *Neuroendocrinology*, 82 (5-6): 306–19.
- Álvarez-Leefmans, F. (2009). Chloride transporters in presynaptic inhibition, pain and neurogenic inflammation. En Álvarez-Leefmans, F., Delpire, E. (eds.). *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System: From Molecules to Diseases*. Primera Edición, *Elsevier Academic Press*: 439-470.
- Alvarez, P., Green, P., Levine, J. (2014). Role for monocyte chemoattractant protein-1 in the induction of chronic muscle pain in the rat. *Pain*, 155(6): 1161–1167.
- Bardin, L., Malfetes, N., Depoortère, R. (2009). Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia and enhances inflammatory pain in rat: relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behavioural Brain Research*, 205 (2): 360–366.
- Bardoni, R., Takazawa, T., Tong, C., Choudhury, P., Scherrer G., MacDermott, A. (2013). Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1279 (1): 90-96.
- Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J., Cervantes-Durán, C., Bravo-Hernández, M., Rocha-González, H., Murbartián, J., Granados-Soto, V. (2014). Role of spinal P2Y6 and P2Y11 receptors in neuropathic pain in rats: possible involvement of glial cells. *Molecular Pain*, 10, 29.

REFERENCIAS

- Basbaum, A., Bautista, M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139 (2): 267-284.
- Basbaum A., Jessell T. (2001). The perception of pain. En Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. (eds). *Principles of Neuroscience*. Mc Graw-Hill, New York, pp. 472-491.
- Beggs, S., Salter, M. (2010). Microglia-neuronal signalling in neuropathic pain hypersensitivity. *Current Opinion in Neurobiology* 20(4): 474–480.
- Beggs, S., Salter, M. (2013). The known knowns of microglia–neuronal signalling in neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 557: 37-42.
- Beggs, S., Trang, T., Salter, M. (2012). P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, 15(8): 1068–1073.
- Boccalon, S., Scaggiante, B., Perissin, L. (2006). Anxiety stress and nociceptive responses in mice. *Life Sciences*, 78 (11): 1225–1230.
- Bonin, R., De Koninck, Y. (2014) A spinal analog of memory reconsolidation enables reversal of hyperalgesia, *Nature Neuroscience*, 17 (8): 1043-1046.
- Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-xavier, C., Brocard, C., Vinay, L. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 16(3): 302–307.
- Bradesi, S., Kokkotou, E., Simeonidis, S., Patierno, S., Ennes, H. (2011). The role of neurokinin 1 receptors in the maintenance of visceral hyperalgesia induced by repeated stress in rats. *Gastroenterology* 130(6): 1729–1742.
- Burgos-Vega, C., Quigley, D., Avona, A., Price, T., Dussor, G. (2016). Dural stimulation in rats causes brain-derived neurotrophic factor-dependent *priming* to subthreshold stimuli including a migraine trigger. *Pain*, 157(12): 2722–2730.
- Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., Poo, M. (2007). Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *Journal of Neuroscience*, 27(19): 5224–5235.
- Carrasco, G., Van De Kar, L. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3): 235–272.

- Cervero, F., Laird, J., García-Nicas, E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *European Journal of Pain*, 7(4): 345-351.
- Chabner, B., Knollman, B. (2012). *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Ciudad de México, México. McGraw-Hill.
- Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J., Lévi, S. (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6 (5).
- Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Poncer, J., Paris, F. (2013). Activity-dependent regulation of the K⁺/Cl⁻ transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons, *Neuroscience*, 33(39): 15488–15503.
- Chaplan, S., Bach, F., Pogrel, J., Chung, J., Yaksh. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1): 55-63.
- Chapmann, R., Tuckett, R., Soung, C. (2009). Pain and stress in a systems perspective. *Journal of Pain*, 6(2): 247–253.
- Chen, X., Green, P., Levine, J., (2011). Stress enhances muscle nociceptor activity in the rat. *Neuroscience*, 185: 166–173.
- Cho, I., Chung, Y., Park, C., Park, S., Li, H., Kim, D., Oh, S. (2006). Systemic administration of minocycline inhibits formalin-induced inflammatory pain in rat. *Brain Research*, 1072(1): 208–214.
- Ciszek, B., Buckley, S., Nackley, A. (2017). Persistent COMT-dependent pain is initiated by peripheral, but not spinal or central, β 2- and β 3- adrenergic receptors, *Anesthesiology*, 124(5): 1122–1135.
- Costa, A., Smeraldi, A., Tassorelli, C., Greco, R., Nappi, G., (2005). Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience Letters*, 383 (1-2): 7–11.
- Costigan, M., Woolf, C. (2000). Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, 1(3): 35–44.

REFERENCIAS

- Coull, J., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070): 1017–1021.
- Coull, J., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S., Nault, F., Sik, A., Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951): 938–942.
- Crettaz, B., Marziniak, M., Willeke, P., Young, P., Hellhammer, D., Stumpf, A., Burgmer, M. (2013). Stress-induced allodynia: evidence of increased pain sensitivity in healthy humans and patients with chronic pain after experimentally induced psychosocial stress. *Plos one*, (8) 8: e69460.
- Da Silva, I., Cucco, S., Bassani, M., Duarte, M., Silveira, P., Vasconcellos, A., Tabajara, A., Dantas, G., Fontella, F., Dalmaz, C., Ferreira, M. (2003). Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats effect of morphine administration. *Neuroscience Research*, 45(3): 277–283.
- Dai, S., Ma, Z. (2014). BDNF-trkB-KCC2-GABA pathway may be related to chronic stress-induced hyperalgesia at both the spinal and supraspinal level. *Medical Hypotheses*, 83(6): 772–774.
- Dina, O., Khasar, S., Gear, R., Levine, J. (2009). Activation of Gi induces mechanical hyperalgesia poststress or inflammation. *Neuroscience*, 160(2): 501–507.
- Dirig, D., Salami, A., Rathbun, M., Ozaki, G., Yaksh, T. (1997). Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *Journal Neuroscience Methods* 76(3): 183-191.
- Duval, F., González, F., Rabia, H. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 48(4): 307–318.
- Egle, U., Van Houdenhove, B., 2006. Fibromyalgia: a stress induced pain illness. *Schmerz*, 20(2): 99–100.
- Eller-Smith, O., Nicol, A., Christianson, J. (2018). Potential mechanisms underlying centralized pain and emerging therapeutic interventions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(35): 1–18.

- Eto, K., Ishibashi, H., Yoshimura, T., Watanabe, M., Miyamoto, A., Ikenaka, K., Nabekura, J. (2012). Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex is insufficient to alleviate chronic pain behavior with reduced expression of neuronal potassium–chloride cotransporter. *The Journal of Neuroscience*, 32(47): 16552–16559.
- Fereidoni, M., Javan, M., Semnani, S., Ahmadiani, A. (2007). Chronic forced swim stress inhibits ultra-low dose morphine-induced hyperalgesia in rats. *Behavioral Pharmacology*, 18(7): 667–672.
- Ferrini, F., Lorenzo, L., Godin, A., Quang, M., De Koninck, Y. (2017). Enhancing KCC2 function counteracts morphine-induced hyperalgesia. *Scientific Reports*, 7(1): 1–8.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T., Laffray, S., Del'Guidice, T., Lorenzo, L., De Koninck, Y. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nature Neuroscience*, 16(2): 183–192.
- Filho, P., Vercelino, R., Cioato, S., Medeiros, L., de Oliveira, C., Scarabelot, V., Torres, I. (2016). Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64: 44–51.
- Flor, H., Birbaumer, N., Schulz, R., Grüsser, M., Mucha, F. (2002). Pavlovian conditioning of opioid and nonopioid pain inhibitory mechanisms in humans. *European Journal of Pain*, 6(5): 395–402.
- Fong, A., Schug, S. (2014). Pathophysiology of pain: a practical primer. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 134(4): 8–14.
- Frank, M., Baratta, M., Sprunger, D., Watkins, L., Maier, S. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1): 47–59.

REFERENCIAS

- Frank, M., Hershman, S., Weber, M., Watkins, L., Maier, S. (2014). Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 ARNm in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 40(1): 191–200.
- Frank, M., Thompson, B., Watkins, L., Maier, S. (2012). Glucocorticoids mediate stress-induced *priming* of microglial pro-inflammatory responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(2): 337–345.
- Fujisawa, H., Ohtani-Kaneko, R., Naiki, M., Okada, T., Masuko, K., Yudoh, K., Suematsu, N., Okamoto, K., Nishioka, K., Kato, T., (2008). Involvement of posttranslational modification of neuronal plasticity-related proteins in hyperalgesia revealed by a proteomic analysis. *Proteomics*, 8 (8): 1706–1719.
- Gagnon, M., Bergeron, M., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R., Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., Valade, I., Bachand K., Wagner, M., Tardif, C., Kianicka, I., Isenring, P., Attardo, G., Coull J., Koninck, Y. (2013). Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nature Medicine*, 19(11): 1524–1528.
- Galan, A., Cervero, F. (2005) Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience*, 133(1): 245-252.
- Gamaro, G., Xavier, M., Denardin, J., Pilger, J., Ely, D., Ferreira, M., Dalmaz, C. (1998). The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiology and Behavior*, 63(4): 693–697.
- Gameiro, G., Andrade, A., Castro, M., Pereira, L., Tambeli, C., Ferraz M., Veiga, A. (2005) The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(2): 338-344.
- Gameiro, G., Gameiro, P., da Silva Andrade, A., Pereira, L., Arthuri, M., Marcondes, F., de Arruda, M. (2006). Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiology and Behavior*, 87(4): 643–649.

- Gao, Y., Zhou, J., Zhu, Y., Kosten, T., Li, D. (2016). Chronic unpredictable mild stress induces loss of GABA inhibition in corticotrophin releasing hormone expressing neurons through NKCC1 upregulation. *Neuroendocrinology*, 104(2):194–208.
- García-Bueno, B., Caso, J., Leza, J. (2008). Neuroscience and biobehavioral reviews stress as a neuroinflammatory condition in brain:damaging and protective mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(6): 1136–1151.
- Geng, S., Liao, F., Dang, H., Ding, X., Liu, X., Cai, J., Xing, G. (2010). Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Experimental Neurology*, 222(2): 256–266.
- George, F. (2000). *Encyclopedia of stress*, San Diego E.U., Academic Press.
- Gibbons, C., Adler, G., Bonyhay, I., Freeman, R. (2012). Experimental hypoglycemia is a human model of stress-induced hyperalgesia. *Pain*, 153(11): 2204–9.
- Gilet., M., Eutamene., H., Han., H., Kim., W., Bueno, L. (2014). Influence of a new 5-HT4 receptor partial agonist, YKP10811, on visceral hypersensitivity in rats triggered by stress and inflammation. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(12): 1761–1770.
- Goldstein, D., Kopin, I. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2): 109–120.
- Goyal., R., Kumar., A. (2007). Protective effect of alprazolam in acute immobilization stress-induced certain behavioral and biochemical alterations in mice. *Pharmacological Reports*, 59(3), 284–290.
- Grande, L., Loeser, J., Ozuna, J., Ashleigh, A., Samii, A. (2004). Complex regional pain syndrome as a stress response. *Pain*, 110(1-2): 495–498.
- Greisen, M., Altar, C., Bolwig, T., Whitehead, R., Wortwein, G. (2005) Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *Journal of Neuroscience Research*, 79(6): 772–778.

REFERENCIAS

- Guan, Z., Kuhn, J., Wang, X., Colquitt, B., Solorzano, C., Vaman, S., Basbaum, A. (2016). Injured sensory neuron derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12 dependent pain. *Nature Neuroscience*, 19(1): 94-101.
- Guevara, C, Fernandez, A., Cardenas, R., Suarez-Roca, H. (2015). Reduction of spinal PGE₂ concentrations prevents swim stress-induced thermal hyperalgesia. *Neuroscience Letters*; 591: 110-114.
- Hammond, D., Drower, E. (1984). Effects of intrathecally administered THIP, baclofen and muscimol on nociceptive threshold. *European Journal of Pharmacology*, 103(1-2): 121-125.
- Hartung, J., Ciszek, B., Nackley, A. (2014). β 2- and β 3-adrenergic receptors drive COMT-dependent pain by increasing production of nitric oxide and cytokines. *Pain*, 155(7): 1346–1355.
- Hata, T., Itoh, E., Kawabata, A. (1991). Changes in CNS levels of serotonin and its metabolite in SART-stressed (repeatedly cold-stressed) rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 56(1): 101-104.
- Hayati., A., Zalina., I., Myo., T., Badariah., C., Azhar., A., Idris, L. (2008). Modulation of formalin-induced fos-like immunoreactivity in the spinal cord by swim stress-induced analgesia, morphine and ketamine. *GMS German Medical Science*, 6, Doc05.
- Hayes, J., Hayes, S., Mikedis, A. (2012). Quantitative meta-analysis of neural activity in posttraumatic stress disorder. *Biology Mood & Anxiety Disorders*, 2, 9.
- Heppenstall, P., Lewin, G. (2001). BDNF but not NT-4 is required for normal flexion reflex plasticity and function. *Proceedings of the National of Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14): 8107-8112.
- Hebert., S., Mount., D., Gamba., G. (2004). Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family. *European journal of physiology*, 447 (5): 580-593.

- Hewitt, S., Wamsteeker, J., Kurz, E., Bains, J. (2009). Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. *Nature Neuroscience*, 12(4): 438–443.
- Hildebrand, M., Xu, J., Dedek, A., Li, Y., Sengar, A., Beggs, S., Salter, M. (2016). Potentiation of synaptic GluN2B NMDAR currents by Fyn kinase is gated through BDNF-mediated disinhibition in spinal pain processing. *Cell Reports*, 17(10): 2753–2765.
- Hong, S., Fan, J., Kemmerer, E., Evans, S., Li, Y., Wiley, J., (2009). Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. *Gastroenterology*, 58(2): 202–210.
- Hong, S., Zheng, G., Wu, X., Snider, N., Owyang, C., Wiley, J., (2011). Corticosterone mediates reciprocal changes in CB1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology*, 140 (2): 627–637 e4.
- Huang, E., Reichardt, L. (2009). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Sleep Medicine*, 2(2): 161–169.
- Huang, Y., Lee, K., Murphy, L., Garraway, S., Grau, J. (2016). Acute spinal cord injury (SCI) transforms how GABA affects nociceptive sensitization. *Experimental Neurology*, 285: 82–95
- Hou, X., Weng, Y., Wang, T., Ouyang, B., Li, Y., Song, Z., Guo, Q. (2018). Suppression of HDAC2 in spinal cord alleviates mechanical hyperalgesia and restores KCC2 expression in a rat model of bone cancer pain. *Neuroscience*, 377: 138–149.
- Imbe, H., Murakami, S., Okamoto, K., Iwai-Liao, Y., Senba, E. (2004). The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain*, 112(3): 361–371.
- Inoue, K., Tsuda, M. (2018). Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(3): 138–152.

REFERENCIAS

- Janssen, S., Gerard, S., Raijmakers, M., Truin, M., Kleef, M. Van, Joosten, E. A. (2012). Neurochemistry international decreased intracellular GABA levels contribute to spinal cord stimulation induced analgesia in rats suffering from painful peripheral neuropathy: the role of KCC2 and GABA_A receptor mediated inhibition. *Neurochemistry International*, 60(1): 21–30.
- Jennings, E., Okine, B., Roche, M., Finn, D. (2014). Progress in neurobiology stress-induced hyperalgesia. *Progress in Neurobiology*, 121: 1–18.
- Ji R. R., Berta T., Nedergaard M. (2013). Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154: S10-28.
- Ji, Y., Hu, Bo., Li, J., Traub, R. (2018) Opposing roles of estradiol and testosterone on stress-induced visceral hypersensitivity in rats, *The Journal of Pain*, 19(7): 764-776.
- Jolivalt, C., Lee, C., Ramos, K., Calcutt, N. (2008). Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain*, 140(1): 48–57.
- Julius, D., Basbaum, A. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852): 203–210.
- Kahle, K., Deeb, T., Puskarjov, M., Silayeva, L., Liang, B. (2015). Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K–Cl cotransporter KCC2. *Trends in Neuroscience*, 36(12): 726–737.
- Kahle, K., Delpire, E. (2015). Kinase-KCC2 coupling: Cl⁻ rheostasis, disease susceptibility, therapeutic target. *Journal of Neurophysiology*, 115 (1): 8–18.
- Kahle, K., Staley, K., Nahed, B., Gamba, G., Hebert, S., Lifton, R., Mount, D. (2008). Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(9): 490-503.
- Kawanishi, C., Fukuda, M., Tamura, R., Nishijo, H., Ono, T. (1997). Effects of repeated cold stress on feeding, avoidance behavior, and pain-related nerve fiber activity. *Physiology and Behavior*, 62(4): 849–855.

- Khasar, S., Burkham, J., Dina, O., Brown, A., Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Levine, J. (2008). Stress induces a switch of intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *Journal of Neuroscience*, 28(22): 5721–5730.
- Khasar, S., Green, P., Levine, J. (2005). Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain*, 116(1–2): 79–86.
- Koyanagi, S., Kusunose, N., Taniguchi, M., Akamine, T., Kanado, Y., Ozono, Y., Ohdo, S. (2016). Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. *Nature Communications*, 7: 1–13.
- Kumari, B., Kumar, A., Dhir, A. (2007). Protective effect of non-selective and selective COX-2-inhibitors in acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations. *Pharmacological Reports*, 59(6): 699–707.
- Lavertu, G., Côté, S., De Koninck, Y. (2014). Enhancing K-Cl co-transport restores normal spinothalamic sensory coding in a neuropathic pain model. *Brain*, 137(3): 724–738.
- Laste, G., Ripoll, J., Caumo, W., Da Silva, I. (2015). Short- but not long-term melatonin administration reduces central levels of brain-derived neurotrophic factor in rats with inflammatory pain. *Neuroimmunomodulation*, 22(6): 358–364.
- Le Roy, C., Laboureyras, E., Gavello, S. (2011). Endogenous opioids released during non-nociceptive environmental stress induce latent pain sensitization via a NMDA-dependent process. *The Journal of Pain*, 12(10): 1069–1079.
- Lee, H., Walker, J., Williams, J., Goodier, R., Payne, J., Moss, S. (2007). Direct Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41): 29777–29784
- Lévi, S., Poncer, J. (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Cellular Neuroscience*, 6(5): 1–15.

REFERENCIAS

- Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Rivera, C. (2007). KCC2 Interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*, 56(6): 1019–1033.
- Li, S., Cai, J., Feng, Z., Jin, Z., Liu, B., Zhao, H., Xing, G. (2017). BDNF contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity via fyn-mediated phosphorylation of NMDA receptor GluN2B subunit at tyrosine 1472 in rats following spinal nerve ligation. *Neurochemical Research*, 42(10): 2712–2729.
- Li, S., Tu, W., Jia, C., Jiang, X., Qian, X., Yang, G., Jiang, S. (2018). KCC2-GABA_A pathway correlates with the analgesic effect of electro-acupuncture in CCI rats. *Molecular Medicine Reports*, 17(5); 6961–6968.
- Lin, C., Cheng, J., Wu, C., Chen, K., Liu, C. (2017). Epigenetic suppression of potassium-chloride co-transporter 2 expression in inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant (CFA). *European Journal of Pain*, 21(2): 309–321.
- Li, L., Chen, S., Chen, H., Wen, L., Hittelman, W., Xie, J., Pan, H. (2016). Chloride homeostasis critically regulates synaptic NMDA receptor activity in neuropathic pain. *Cell Reports*, 15(7): 1376–1383.
- Li, M., Liu, L., Chen, L., Cai, J., Wan, Y., Xing, G. (2017). Chronic stress exacerbates neuropathic pain via the integration of stress-affect-related information with nociceptive information in the central nucleus of the amygdala. *Pain*, 158(4): 717–739.
- Li, X., Li, M., Zhou, Z., Liu, B., Chen, H. (2016). Chronic restraint stress exacerbates nociception and inflammatory response induced by bee venom in rats: the role of the P2X7 receptors. *Neurological Research*, 38(2): 158-165.
- Lian, Y., Lu, Q., Chang, J., Zhang, Y. (2017). The role of glutamate and its receptors in central nervous system in stress-induced hyperalgesia. *International Journal of Neuroscience*, 128(3): 283-290.

- Lightman, S., Wiles, C., Atkinson, H., Henley, D., Russell, G., Leendertz, J., Conway, B. (2008). The significance of glucocorticoid pulsatility. *European Journal of Pharmacology*, 583(2–3): 255–262.
- Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C., Plotsky, P., Monteggia, L. (2007) Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 25 (10): 3091–3098.
- Loeser, J., Treede, R. (2008). The kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*, 137(3): 473–477.
- Loeza-Alcocer, E., Canto-Bustos, M., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Felix, R., Delgado-Lezama, R. (2013). $\alpha 5$ GABA_A receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 110(9): 2175-2184.
- Ma, K., Si, J., Zhang, Z., Zhao, L., Fan, P., Jin, J., Li, X., Zhu, L., (2006). Modulatory effect of CCK-8S on GABA-induced depolarization from rat dorsal root ganglion. *Brain Research*, 1121(1): 66–75.
- Melemedjian, O., Asiedu, M., Tillu, D., Peebles, K., Ertz, N., Dussor, G., Price, T. (2011). IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F Complex. *The journal of Neuroscience*, 30(45): 15113–15123.
- Madalena, K., Lerch, J., (2017). The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity. *Neural Plasticity*, 2017: 1-8.
- Matayoshi, S., Jiang, N., Katafuchi, T., Koga, K., Furue, H., Yasaka, T., Yoshimura, M. (2005). Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat. *Journal of Physiology*, 569(2): 685–695
- McMahan, S., Koltzenburg, M., Tracey, I., Turk, D., (2013). *Wall and Melzack's. Textbook of Pain*, Philadelphia E.U. Elsevier.
- Melemedjian, O., Asiedu M., Tillu D. (2010) IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *Journal of Neuroscience*, 30 (45): 15113–15123.

REFERENCIAS

- Melemedjian, O., Tillu, D., Asiedu, M., Mandell, E., Moy, J., Blute, V., Price, T. (2013). BDNF regulates atypical PKC at spinal synapses to initiate and maintain a centralized chronic pain state. *Molecular Pain*, 9(1): 1–14.
- Melemedjian, O., Tillu, D., Moy, J., Moy, J., Asiedu, A., Ghosh, S., Dussor, G., Price, T. (2014). Local translation and retrograde axonal transport of CREB regulates IL-6-induced nociceptive plasticity. *Molecular Pain*, 10:45.
- Merighi, A., Salio, C., Ghirri, A., Lossi, L., Ferrini, F., Betelli, C., Bardoni, R. (2008). BDNF as a pain modulator. *Progress in Neurobiology*, 85(3): 297–317.
- Mert, T., Sahin, E., Yaman, S., Sahin, M. (2018). Pain-relieving effectiveness of co-treatment with local tramadol and systemic minocycline in carrageenan-induced inflammatory pain model. *Inflammation*, 1–12.
- Miletic, G., Miletic, V. (2008). Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain*, 137(3): 532–539.
- Miller, S., Maguire, J. (2014). Deficits in KCC2 and activation of the HPA axis lead to depression-like behavior following social defeat. *Hormonal Studies*, 2:2.
- Milligan, E., Watkins, L. (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(1): 23–36.
- Million., M., Zhao., F., Luckey., A., Czimmer., J., Maynard., D., Kehne., J., Taché., Y. (2013). The Newly Developed CRF1-Receptor Antagonists, NGD 98-2 and NGD 9002, Suppress Acute Stress-Induced Stimulation of Colonic Motor Function and Visceral Hypersensitivity in Rats. *PLoS ONE*, 8(9): 13–15.
- Myers, B., Greenwood-Van Meerveld, B., (2007). Corticosteroid receptor-mediated mechanisms in the amygdala regulate anxiety and colonic sensitivity. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 292(6): 1622–1629.

- Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., Garrido, P. (2012). Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Research*, 1476(2): 71–85.
- Mòdol, L., Cobianchi, S., Navarro, X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 155(8): 1577–1590.
- Nomura, H., Sakai, A., Nagano, M., Umino, M., Suzuki, H. (2006). Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neuroscience Research*, 56(4): 435–440.
- Norman, G., Karelina, K., Zhang, N., Walton, J., Morris, J., Devries, A. (2010) Stress and IL-1beta contribute to the development of depressive-like behavior following peripheral nerve injury. *Molecular Psychiatry*, 15(4): 404–414.
- Novais, A., Monteiro, S., Roque, S., Correia, M., Sousa, N. (2017). How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiology of Stress*, 6: 44–56.
- Ohashi-Doi, K., Himaki, D., Nagao, K., Kawai, M., Gale, J., Furness, J., Kurebayashi, Y. (2010). A selective, high affinity 5-HT_{2B} receptor antagonist inhibits visceral hypersensitivity in rats. *Neurogastroenterology and Motility*, 22(2): 69-76.
- Obata, K., Noguchi, K. (2006). BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neuroscience Research*, 55(1): 1–10.
- Ossipov, M., Dussor, G., Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 3779-3787.
- Ossipov, M., Morimura, K., Porreca, F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 8(2): 143-151.
- Parada, C., Yehh, J., Reichling, D., Levine. (2003) Transient attenuation of protein kinase C epsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*, 120 (1): 219–226.

REFERENCIAS

- Pezet, S., Malcangio, M., Lever, I., Perkinson, M., Thompson, S., Williams, R., McMahon, S. (2002). Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 21(4): 684–695.
- Pezet, S., Malcangio, M., McMahon, S. (2002). BDNF: A neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Research*, 40(1-3): 240–249.
- Porro, C., Carli, G. (1988). Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. *Pain*, 32(3): 289–307.
- Prescott, S. (2015). Synaptic inhibition and disinhibition in the spinal dorsal horn. *Molecular and Cell Biology of Pain*, 131: 359-383.
- Price, T., Geranton, S. (2009) Translating nociceptor sensitivity: the role of axonal protein synthesis in nociceptor physiology. *European Journal of Neuroscience*, 29 (12): 2253–2263.
- Price, T., Cervero, F., Gold, M., Hammond, D., Prescott, S. (2008). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews*, 60(1): 149–170.
- Price, T. J., Cervero, F., De Koninck, Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(6): 547–555.
- Price, T., Inyang, K. (2015). Commonalities between pain and memory mechanisms and their meaning for understanding chronic pain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 131: 409–434.
- Price, T., Geranton, S. (2009). Translating nociceptor sensitivity: the role of axonal protein synthesis in nociceptor physiology. *European Journal Neuroscience*, 29(12): 2253–2263.
- Price T., Prescott S. (2015). Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*, 156(5): 789-792.
- Puskarjov, M., Ahmad, F., Khirug, S., Sivakumaran, S., Kaila, K., Blaesse, P. (2015). BDNF is required for seizure-induced but not developmental up-regulation of KCC2 in the neonatal hippocampus. *Neuropharmacology*, 88: 103–109.

- Qiu, L., Huang, X., Zhang, J., Wang, Y., Kuang, W., Li, J., Wang, X., Wang, L., Yang, X., Lui, S., Mechelli, A., Gong, Q. (2013). Characterization of major depressive disorder using a multiparametric classification approach based on high resolution structural images. *Journal of Psychiatry Neuroscience*, 39 (2): 78-86.
- Quintero, L., Cardenas, R., Suarez-Roca, H., (2011). Stress-induced hyperalgesia is associated with a reduced and delayed GABA inhibitory control that enhances post-synaptic NMDA receptor activation in the spinal cord. *Pain*, 152(8): 1909–1922.
- Raghavendra, V. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2): 624–630.
- Rivat, C., Becker, C., Blugeot, A., Zeau, B., Mauborgne, A., Pierre, U. (2010). Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain*, 150(2): 358–368.
- Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Saarma, M. (2002). BDNF-induced TrkB activation downregulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *Journal of Cell Biology*, 159(5): 747–752.
- Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipila, S., Payne, J., Minichiello, L., Saarma, M., Kaila, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *Journal of Neuroscience*, 24(19): 4683–4691.
- Sacktor, T. (2011) How does PKMzeta maintain long-term memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 12: 9–15.
- Sarkar, J., Wakefield, S., MacKenzie, G., Moss, S., Maguire, J. (2011) Neurosteroidogenesis is required for the physiological response to stress: role of neurosteroid-sensitive GABA_A receptors. *Journal of Neuroscience*, 31(50): 18198–18210.

REFERENCIAS

- Sedmak, G., Jovanov-Milošević, N., Puskarjov, M., Ulamec, M., Krušlin, B., Kaila, K., Judaš, M., (2016). Developmental expression patterns of KCC2 and functionally associated molecules in the human brain. *Cerebral Cortex*, 26 (12): 4574–4589,
- Scholz, J., Woolf, C. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 5: 1062-1067.
- Schulte-Herbruggen, O., Chourbaji, S., Ridder, S., Brandwein, C., Gass, P., Hortnagl, H. (2006). Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology*, 31(10): 1266–77.
- Shaqura, M., Li, X., Al-Khrasani, M., Shakibaei, M., Tafelski, S., Fürst, S., Mousa, S. (2016). Membrane-bound glucocorticoid receptors on distinct nociceptive neurons as potential targets for pain control through rapid non-genomic effects. *Neuropharmacology*, 111: 1–13.
- Shi, M., Qi, W., Gao, G., Wang, J., Luo, F. (2010). Increased thermal and mechanical nociceptive thresholds in rats with depressive-like behaviors. *Brain Research*, 1353: 225–233.
- Shi, S., Shao, S., Yuan, B., Pan, F., Li, Z. (2010). Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei Medical Journal*, 51(5): 661–671.
- Shu, X., Llinas, A., Mendell, L. (1999). Effects of TrkB and TrkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. *Pain*, 80(3): 463–470.
- Sorge, R., Mapplebeck, J., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J., Philip, J. (2016). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, 18(8): 1081–1083.
- Sorrells, S., Caso, J., Munhoz, C., Sapolsky, R. (2009). The Stressed CNS: When glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron*, 64(1): 33–39.

- Spezia, L., Caumo, W., Laste, G., Fernandes, L., Ripoll, J., De Souza, A., Fregni, F., Torres, I. (2012). Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research*, 1489: 17–26.
- Staud, R. (2012). Abnormal endogenous pain modulation is a shared characteristic of many chronic pain conditions. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(5): 577-585.
- Staud, R. (2004). Fibromyalgia pain: Do we know the source? *Current Opinion in Rheumatology*;16 (2):157–163.
- Suarez-Roca, H., Leal, L., Silva, J., Pinerua-Shuhaibar, L., Quintero, L., (2008). Reduced GABA neurotransmission underlies hyperalgesia induced by repeated forced swimming stress. *Behavioural Brain Research*, 189(1): 159–169.
- Suarez-Roca, H., Quintero, L., Avila, R., Medina, S., De Freitas, M., Cárdenas, R. (2014). Central immune overactivation in the presence of reduced plasma corticosterone contributes to swim stress-induced hyperalgesia. *Brain Research Bulletin*, 100: 61–69.
- Sun, R., Zhao, Z., Feng, J., Bo, J., Rong, H., Lei, Y., Gu, X. (2017). Glucocorticoid-potentiated spinal microglia activation contributes to preoperative anxiety-induced postoperative hyperalgesia. *Molecular Neurobiology*, 54(6): 4316–4328.
- Suter, M., Wen, Y., Decosterd, I, Ji, R. (2007) Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biology*, 3(3): 255-268.
- Tang, D., Qian, A., Song, D., Ben, Q., Yao, W., Sun, J., Yuan, Y. (2015). Role of the potassium chloride cotransporter isoform 2-mediated spinal chloride homeostasis in a rat model of visceral hypersensitivity. *Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 308(9): 767–778.
- Taves, S., Berta, T., Liu, D., Gan, S., Chen, G., Kim, Y., Ji, R. (2016). Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55: 70–81.

REFERENCIAS

- Tramullas, M, Finger, B., Moloney, R., Golubeva, A., Moloney, G., Dinan, T., Cryan, J. (2014). Toll-like receptor 4 regulates chronic stress-induced visceral pain in mice. *Biology Psychiatry*, 76(4): 340-348.
- Tsuda, M. (2016). Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(1): 17–26.
- Tsukahara, T., Masuhara, M., Iwai, H., Sonomura, T., Sato, T. (2015). Repeated stress-induced expression pattern alterations of the hippocampal chloride transporters KCC2 and NKCC1 associated with behavioral abnormalities in female mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(1): 145–151.
- Tsukahara, T., Masuhara, M., Iwai, H., Sonomura, T., Sato, T. (2016). The effect of repeated stress on KCC2 and NKCC1 immunoreactivity in the hippocampus of female mice. *Data in Brief*, 7(6): 521–525.
- Uchoa, E., Aguilera, G., Herman, J., Fiedler, J., Deak, Y. (2014). Novel aspects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and glucocorticoid actions. *Neuroendocrinology*, 193(1): 557–552.
- Ulmann, L., Hatcher, J., Hughes, J., Chaumont, S., Green, P., Conquet, F., Rassendren, F. (2008). Up-Regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, 28(44): 11263–11268.
- Valente, M., Bortolotto, V., Cuccurazzu, B., Ubezio, F., Meneghini, V., Francese, M. T., Grilli, M. (2012). 2 Ligands Act as Positive Modulators of Adult Hippocampal Neurogenesis and Prevent Depression-Like Behavior Induced by Chronic Restraint Stress. *Molecular Pharmacology*, 82(2): 271–280.
- van Bodegom, M., Homberg, J., Henckens, M. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(4): 1–33.
- Van Houdenhove, B., Luyten, P. (2006). Stress, depression and fibromyalgia. *Acta Neurologica Belgica*, 106: 149–156.

- Velazquez-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.
- Vinay, L., Jean-Xavier, C. (2008). Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain research reviews*, 57(1): 103-110.
- Wagner, K., Roeder, Z., Desrochers, K., Buhler, A., Heinricher, M., Cleary, D. (2013). The dorsomedial hypothalamus mediates stress-induced hyperalgesia and is the source of the pronociceptive peptide cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, 238: 29–38.
- Walker, L., Sherman, A., Bruehl, S., Garber, J., Smith, C. (2012). Functional abdominal pain patient subtypes in childhood predict functional gastrointestinal disorders with chronic pain and psychiatric comorbidities in adolescence and adulthood. *Pain*, 153(9): 1798-1806.
- Winston, J., Li, Q., Sarna, S. (2014). Chronic prenatal stress epigenetically modifies spinal cord BDNF expression to induce sex-specific visceral hypersensitivity in offspring. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(5): 715–730.
- Woda, A., Picard, P., Dutheil, F. (2016). Dysfunctional stress responses in chronic pain, *Psychoneuroendocrinology*, 71: 127–135.
- Wodarski., R., Schuh-Hofer., S., Yurek., A., Wafford., A., Gilmour, G., Treede, D., Kennedy, D. (2015). Development and pharmacological characterization of a model of sleep disruption-induced hypersensitivity in the rat. *European Journal of Pain*, 19(4): 554–566.
- Woolf, C. American College of Physicians, A.P.S. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Pain*, 137(3): 473-7.
- Wu, L., Huang, J., Wang, W., Wang, W., Wang, X., Wu, S. (2009). Down-regulation of K^+-Cl^- co-transporter 2 in mouse medullary dorsal horn contributes to the formalin-induced. *Neuroscience Letters*, 457(1): 36–40.

REFERENCIAS

- Yajima, Y., Narita, M., Narita, M., Matsumoto, N., Suzuki, T., (2002). Involvement of a spinal brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB pathway in the development of nerve injury-induced thermal hyperalgesia in mice. *Brain Research*, 958(2): 338–346.
- Yajima, Y., Narita, M., Usui, A., Kaneko, C., Miyatake, M., Narita, M., Yamaguchi, T., Tamaki, H., Wachi, H., Seyama, Y., Suzuki, T. (2005). Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *Journal of Neurochemistry*, 93(3): 584–594.
- Yasui, M., Yoshimura, T., Takeuchi, S., Tokizane, K., Tsuda, M., Inoue, K., Kiyama, H. (2014). A Chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia*, 62(9): 1407–1417.
- Zhang, W., Liu, L., Xu, T. (2008). Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*, 152(2): 502–510.
- Zhang, Z., Wang, X., Wang, W., Lu, Y., Pan, Z. (2013). Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K⁺-Cl⁻ cotransporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Molecular Pharmacology*, 84(4): 511–520.
- Zhou, X., Deng, Y., Xian, C., Zhong, J., (2000). Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *European Journal of Neuroscience*, 12 (1): 100-105.
- Zhou, L., Yang, T., Wei, X., Liu, Y., Xin, W., Chen, Y., Pang, R., Zang, Y., Li Y., Liu, X. (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.
- Zou., J., Liu, D., Zhou, C. (2001). Roles of central interleukin-1 on stress-induced-hypertension and footshock-induced-analgesia in rats. *Neuroscience Letters*, 311(1): 41–44.

- Zubieta, J., Smith, Y., Bueller, J., Xu, Y., Kilbourn, M., Jewett, D., Meyer, C., Koeppe, R., Stohler, C. (2001). Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science*, 293(5528): 311–315.