



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

**Sede Sur**

**Departamento de Farmacobiología**

**Estudio de la participación de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la  
alodinia táctil observada en ratas con restricción de sueño MOR.**

Tesis que presenta

**Médico Cirujano Paulina Andrea Muñoz Castillo**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directora de la Tesis:

**Dra. Janet Murbartián Aguilar**

**Ciudad de México**

**Noviembre, 2018**



El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. La dirección de esta tesis estuvo a cargo de la doctora Janet Murbartián Aguilar.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través de la beca de maestría No. 614648.



## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al CINVESTAV por brindarme el apoyo para realizar mis estudios de posgrado y concluir satisfactoriamente este trabajo de tesis.

Gracias al Conacyt por la beca otorgada para que pudiera realizar este trabajo de tesis.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Janet Murbartián Aguilar, por abrirme las puertas de su laboratorio. Gracias por los regañones, la paciencia y todo su apoyo. Le estoy profundamente agradecida.

Gracias al comité sinodal integrado por la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y la Dra. María Angélica Almanza Gutiérrez, cuyos comentarios y sugerencias nutrieron considerablemente este proyecto de tesis.

Al personal del bioterio por proporcionarme las ratas necesarias para los experimentos y resolver todas mis dudas.

A todos mis compañeros del laboratorio 4. Especialmente a Roxana Noriega Navarro por tantas pláticas y comidas juntas.

A mis primeros amigos en el posgrado: Marysol Segovia Oropeza, Saúl Huerta de la Cruz, Cindy Lizbeth Santiago Castañeda, Lourdes Adriana Álvarez Silva y Erick Josué Rodríguez Palma. Sin ustedes cambiar los hospitales por el laboratorio hubiera sido muy difícil. Gracias Marysol por soportar todas mis quejas, por siempre estar atenta a mis jornadas en el laboratorio y por tu amistad.

A Phillip Joseph Bonnet Camacho, por tanto amor y apoyo. Tu ayuda ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto. Gracias por siempre creer en mí y motivarme a superarme todos los días. Eres mi inspiración.

A Carlos Adrián Robledo López, por ser el mejor amigo posible. Gracias por todo lo que has hecho por mí.

A mi hermano, Francisco Javier Muñoz Castillo, por enseñarme a luchar por todos mis sueños. A pesar de la distancia siempre me acompaña tu sonrisa. Te quiero mucho.

Finalmente, agradezco a mis padres Aurora Castillo Guzmán y Francisco Javier Muñoz Figueroa por todos los esfuerzos y sacrificios que han hecho para que pueda alcanzar todas mis metas. Gracias ser excelentes padres. Los quiero mucho.

## INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	I
LISTA DE ABREVIATURAS .....	II
<b>1. RESUMEN</b> .....	V
<b>2. ABSTRACT</b> .....	VI
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
3.1. Dolor .....	1
3.1.1. Definición y clasificación del dolor .....	1
3.1.2. Fisiología del dolor .....	3
3.1.3. Vía ascendente y vía descendente del dolor .....	6
3.1.4. Sensibilización .....	8
3.1.5. Papel del ion Cl <sup>-</sup> en la nocicepción .....	10
3.1.6. Despolarización aferente primaria y reflejos de raíz dorsal .....	11
3.2. Papel de los canales iónicos en la nocicepción .....	13
3.2.1. Receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1 (TRPV1) .....	14
3.2.2. Canal anoctamina-1 .....	17
3.3. Sueño y dolor .....	19
3.3.1. Ciclo del sueño .....	19
3.3.2. Privación de sueño .....	21
3.3.3. Efecto de la restricción de sueño en la nocicepción .....	22
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	27

6.1. Objetivo general .....	27
6.2. Objetivos particulares .....	27
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
7.1. Materiales .....	28
7.1.1 Animales de experimentación .....	28
7.1.2. Fármacos .....	28
7.2. Métodos .....	29
7.2.1. Privación de sueño de movimientos oculares rápidos (PMOR) .....	29
7.2.2. Evaluación de la nocicepción mecánica .....	30
7.2.3. Determinación de la expresión de proteínas totales por <i>Western-blot</i> .....	31
7.2.3.1. Extracción de tejidos y obtención de proteínas totales .....	31
7.2.3.3. Cuantificación de proteínas totales .....	32
7.2.3.4. <i>Western-blot</i> .....	32
7.2.4. Diseño experimental .....	34
7.2.5. Análisis estadístico .....	35
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
8.1. Replicación del modelo de plataformas múltiples para la PMOR en ratas de la cepa Wistar .....	36
8.1.1. Curso temporal de la alodinia inducida por PMOR .....	36
8.1.2. El género no modifica la alodinia mecánica inducida por PMOR .....	36

8.2. Determinación de la efectividad de fármacos analgésicos utilizados para el tratamiento del dolor sobre la alodinia táctil inducida por PMOR .....	38
8.3. Participación de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR .....	40
8.3.1. Efecto del A-784168 en la alodinia táctil inducida por PMOR .....	40
8.3.2. Efecto del T16A <sub>inh-A01</sub> , y de MONNA en la alodinia táctil inducida por PMOR .....	41
8.3.3. Efecto de la combinación de A-784168 con T16A <sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la alodinia táctil inducida por PMOR .....	41
8.4 Efecto de la PMOR en la expresión de TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal dorsal y GRD de ratas .....	44
8.5 Efecto de la PMOR en la expresión de anoctamina-1 en el asta dorsal de la médula espinal dorsal y GRD de ratas .....	44
8.5 Efecto de la PMOR en la expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal dorsal y GRD de ratas .....	47
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	48
9.1. Pronocicepción inducida por privación de sueño MOR .....	48
9.2. Efectividad de fármacos analgésicos sobre la magnitud de la alodinia táctil inducida por PMOR .....	50
9.3. Participación de los canales TRPV1 en la alodinia mecánicas inducida por PMOR .....	53
9.4. Participación de los canales anoctamina-1 en la alodinia mecánica inducida por PMOR .....	54
9.5. Regulación de la expresión de los canales TRPV1 y anoctamina-1 inducida por PMOR .....	56
9.6. Expresión de ATF3 en la PMOR .....	57

<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	58
<b>12. REFERENCIAS</b> .....	59

## INDICE DE FIGURAS

1. Clasificación del dolor .....	2
2. Activación de los nociceptores por estímulos inocuos y estímulos nocivos .....	4
3. Vías del dolor .....	6
4. Papel del ion $Cl^-$ en la nocicepción .....	12
5. Papel de los canales iónicos en la nocicepción .....	13
6. Estructura del canal TRPV1 .....	15
7. Estructura propuesta de anoctamina-1 .....	18
8. Esquema de la caja de experimentación para la PMOR .....	30
9. Diseño experimental .....	35
10. Curso temporal de la alodinia inducida PMOR .....	37
11. Efecto de fármacos analgésicos utilizados para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático sobre la alodinia táctil inducida por PMOR .....	39
12. Efecto de la cafeína sobre la alodinia táctil inducida por PMOR .....	40
13. Participación de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR .....	42
14. Efecto de la co-administración del antagonista del canal TRPV1 y los bloqueadores del canal anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR ...	43
15. Efecto de la PMOR sobre la expresión del canal TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD .....	45
16. Efecto de la PMOR sobre la expresión de anoctamina-1 en la asta dorsal de la médula espinal y GRD .....	46
17. Efecto de la PMOR sobre la expresión de ATF3 en la asta dorsal de la médula espinal y GRD .....	47

## INDICE DE TABLAS

1. Efectos asociados a la privación de sueño .....	22
2. Vías de administración y dosis de los fármacos utilizados .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
8TM	8 dominios transmembranales
°C	Grados Celsius
[Cl] <sub>e</sub>	Concentración extracelular de Cl <sup>-</sup>
[Cl] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de Cl <sup>-</sup>
A-784168	3,6-dihidro-3'-(trifluorometil)-N-[4-[(trifluorometil)sulfonyl]fenil]-[1(2H),2'-bipiridina-4-carboxamida
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANO1	Anoctamina-1
ANOVA	Análisis de varianza
ASIC	Canales iónicos sensibles al ácido
ATF3	Factor de transcripción dependiente de AMPc 3
Cl <sup>-</sup>	Cloruro
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
Ca <sub>v</sub>	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje
CaCCs	Canales de Cl <sup>-</sup> activados por Ca <sup>2+</sup>
Caf	Cafeína

CaM	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulina
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRR	Reflejo de la raíz dorsal
DUF590	Dominio de función desconocida 590
Eact	3,4,5-trimetoxi-N-(2-metoxietil)-N-(4-fenil-2-tiazolil)benzamida
E <sub>Cl</sub>	Potencial de equilibrio del Cl <sup>-</sup>
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
Indo	Indometacina
i.t.	Intratecal
IB4	Isolectina B4
Gbp	Gabapentina
IL	Interleucina
GNDF	Factor neurotrófico derivado de la glia
kDa	Kilodalton
K <sub>v</sub>	Canales de K <sup>+</sup> dependientes de voltaje
mg	Miligramos
MAO-B	Monoaminoxidasa B
MONNA	N-((4-metoxi)-2-naftil)ácido-5-nitroantranílico
MOR	Movimientos oculares rápidos
Na <sup>+</sup>	Sodio
NADA	N-araquidonil-dopamina
Na <sub>v</sub>	Canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRM	Núcleo del rafe magno

P2X	Receptores purinérgicos 2X
PKA	Protein cinasa A
PKC	Protein cinasa C
PAD	Despolarización aferente primaria
pH	Potencial de hidrógeno
PLC	Fosfolipasa C
POVL	Núcleo preóptico ventrolateral
s.c.	Subcutánea
SARA	Sistema activador reticular ascendente
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SGP	Sustancia gris periacueductal
SP	Sustancia P
T16A <sub>inh-A01</sub>	2-[(5-etil-1,6-dihidro-4-metil-6-oxo-2-pirimidinil)tio]-N-[4-(4-metoxifenil)-2-tiazolil]acetamida
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPA1	Receptor de potencial transitorio ankirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio subtipo vanilloide miembro 1
μL	Microlitros
μM	Micromolar
V	Volts

## 1. RESUMEN

El dolor crónico y los trastornos del sueño son dos fenómenos que mantienen una relación directa y recíproca de tal manera que el dolor puede producir mala calidad de sueño y la falta de sueño puede llevar a un estado de hipersensibilidad e interferir con la efectividad de tratamientos analgésicos. Estudios en animales han demostrado que la privación de sueño MOR incrementa la sensibilidad nociceptiva. Los estímulos potencialmente dañinos son detectados por las fibras aferentes primarias, llamadas nociceptores, cuyos somas se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (GRD). Los nociceptores expresan un repertorio amplio de canales iónicos, entre ellos el TRPV1 y anoctamina-1. Los procesos de inflamación y de daño axonal desencadenan cambios en la expresión y función de estos canales, generando un aumento de la excitabilidad de los nociceptores. Se ha descrito que los canales TRPV1 y anoctamina-1 participan en el proceso nociceptivo en el dolor inflamatorio (agudo y crónico) y neuropático. De hecho, TRPV1 participa también en procesos de dolor disfuncional. Sin embargo, hasta ahora no se conoce el papel y regulación de los canales iónicos TRPV1 y anoctamina-1 en la hipersensibilidad dolorosa inducida por trastornos del sueño. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el papel de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la generación y mantenimiento de la alodinia observada en ratas con privación de sueño MOR. La administración intratecal de los antagonistas de TRPV1 (A-784168) o los bloqueadores de anoctamina-1 (T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA) disminuyó la alodinia táctil inducida por privación de sueño MOR. Por otra parte, la privación de sueño MOR aumentó la expresión de TRPV1 en los GRD y en la asta dorsal de la médula espinal. Asimismo, la privación de sueño MOR redujo la expresión de anoctamina-1 en ambos tejidos. Los datos obtenidos sugieren que principalmente TRPV1, y de manera muy modesta anoctamina-1, participan en la generación de alodinia táctil inducida por la privación de sueño MOR.

## 2. ABSTRACT

Chronic pain and sleep disorders are two phenomena that have a direct and reciprocal relationship such that pain can produce poor quality of sleep and the lack of sleep can lead to a state of hypersensitivity and interfere with the effectiveness of analgesic treatments. Studies in animals have shown that REM sleep deprivation increases nociceptive sensitivity. Potentially harmful stimuli are detected by the primary afferent fibers, called nociceptors, whose somas are located in the dorsal root ganglia (DRG). Nociceptors express a broad repertoire of ion channels, including TRPV1 and anoctamine-1. The processes of inflammation and axonal degeneration trigger changes in the expression and function of these channels, generating an increase in the excitability of nociceptors. It has been described that TRPV1 and anoctamine-1 channels participate in the nociceptive process in inflammatory (acute and chronic) and neuropathic pain. In fact, TRPV1 participates in dysfunctional pain processes. However, the role and regulation of the ion channels TRPV1 and anoctamine-1 in the painful hypersensitivity induced by sleep disorders is not known until now. Therefore, the objective of the present study was to determine the role of TRPV1 and anoctamine-1 channels in the generation and maintenance of allodynia observed in rats with REM sleep deprivation. Intrathecal administration of the TRPV1 antagonists (A-784168) or the anoctamine-1 blockers (T16Ainh-A01 and MONNA) decreased the tactile allodynia induced by REM sleep deprivation. On the other hand, REM sleep deprivation increased the expression of TRPV1 in the DRGs and in the dorsal horn of the spinal cord. Likewise, REM sleep deprivation decreased the expression of anoctamine-1 in both tissues. The data obtained suggest that TRPV1, and very modestly anoctamine-1, participate in the generation of tactile allodynia induced by REM sleep deprivation.

### **3. INTRODUCCIÓN**

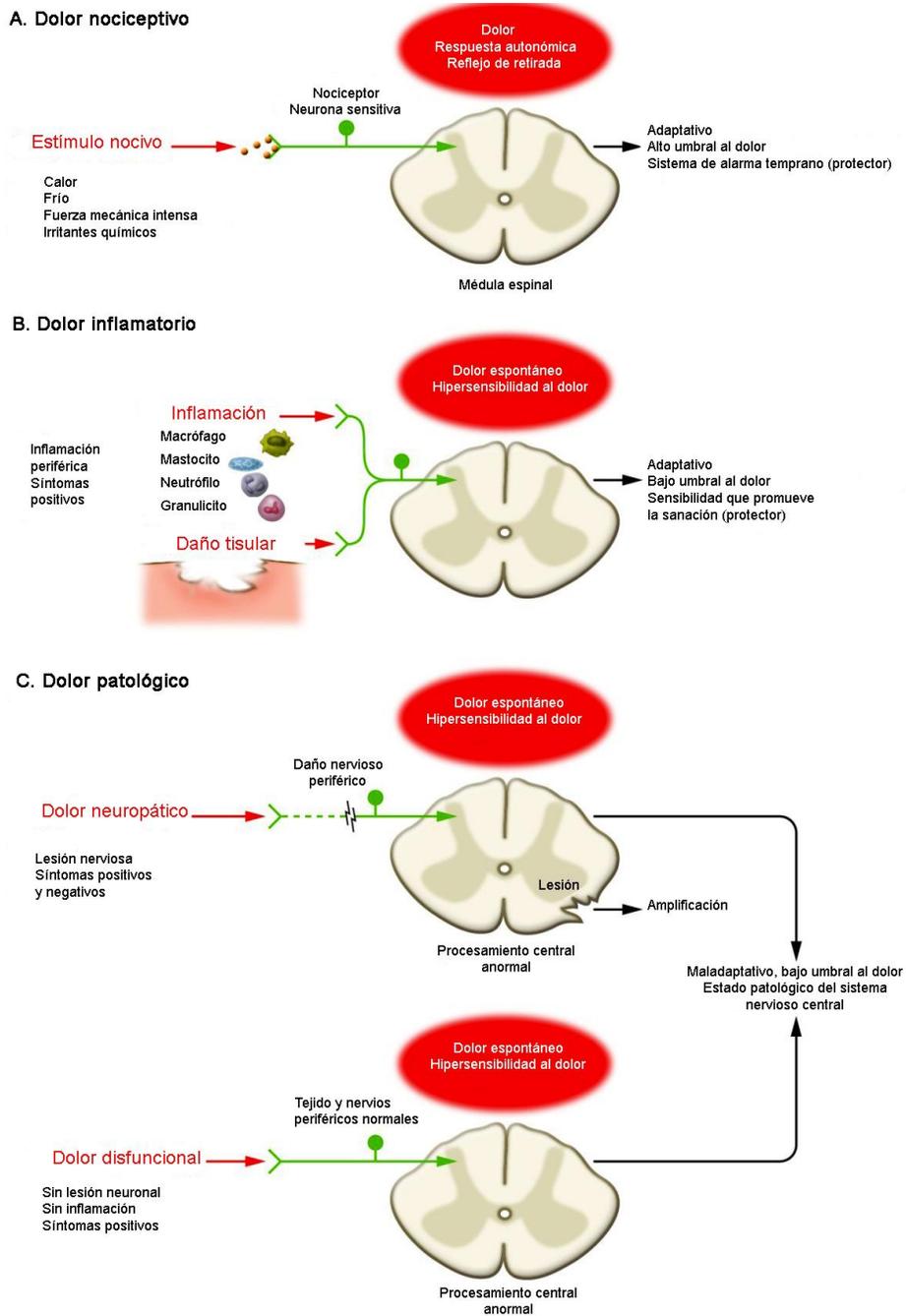
#### **3.1. Dolor**

##### **3.1.1. Definición y clasificación del dolor**

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial, que puede ser descrita en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979), éste tiene la función fisiológica de promover la supervivencia e integridad de un organismo ante estímulos nocivos (Tracey y Mantyh, 2007). Sin embargo, situaciones en las que ocurren alteraciones en el procesamiento del dolor conducen a un estado anormal de hipersensibilidad, de tal manera que el papel del dolor pierde su función de sistema de alarma y se vuelve patológico, lo que conlleva a que estímulos inocuos sean percibidos como dolorosos (alodinia) y estímulos dolorosos se perciban con mayor intensidad (hiperalgesia) (Basbaum et al., 2009).

El dolor se clasifica en: nociceptivo, inflamatorio, neuropático y disfuncional (Fig. 1). El dolor nociceptivo es aquel que tiene como función proteger al organismo de daños reales o potenciales. Este tipo de dolor ocurre sólo cuando el estímulo es lo suficientemente intenso para alcanzar el umbral de activación de los nociceptores y persiste mientras el estímulo esté presente (Costigan y Scholz, 2009).

El dolor inflamatorio se genera como respuesta a un daño tisular y su subsecuente respuesta inflamatoria; su función es proteger al organismo contra un nuevo daño y permitir que el tejido afectado sane correctamente. Típicamente este dolor desaparece después de la resolución del daño tisular inicial; sin embargo, en algunos padecimientos crónicos puede persistir tanto como la inflamación permanezca activa (Woolf, 2010).



**Figura 1. Clasificación del dolor.** A) El dolor nociceptivo tiene la función protectora de detectar estímulos nocivos potencialmente dañinos. B) El dolor inflamatorio se asocia con daño tisular y la infiltración de células inmunes. Este es auxiliar a la reparación debido a que causa hipersensibilidad al dolor hasta que el daño se ha resuelto. C) El dolor patológico es un estado de enfermedad causado por daño al sistema nervioso (neuropático) o por su función anormal (disfuncional). (Modificada de Woolf, 2010).

El dolor neuropático es consecuencia de una lesión del sistema nervioso periférico o del sistema nervioso central. Puede generarse a partir de un estado agudo y persiste por períodos de tiempo prolongados, generando respuestas nociceptivas como la hiperalgesia y la alodinia. Los mecanismos asociados al dolor neuropático son la generación de impulsos ectópicos, la transducción ectópica, la sensibilización periférica y central, la neurodegeneración y cambios estructurales en el sistema nervioso (Woolf, 2010; Costigan y Scholz, 2009).

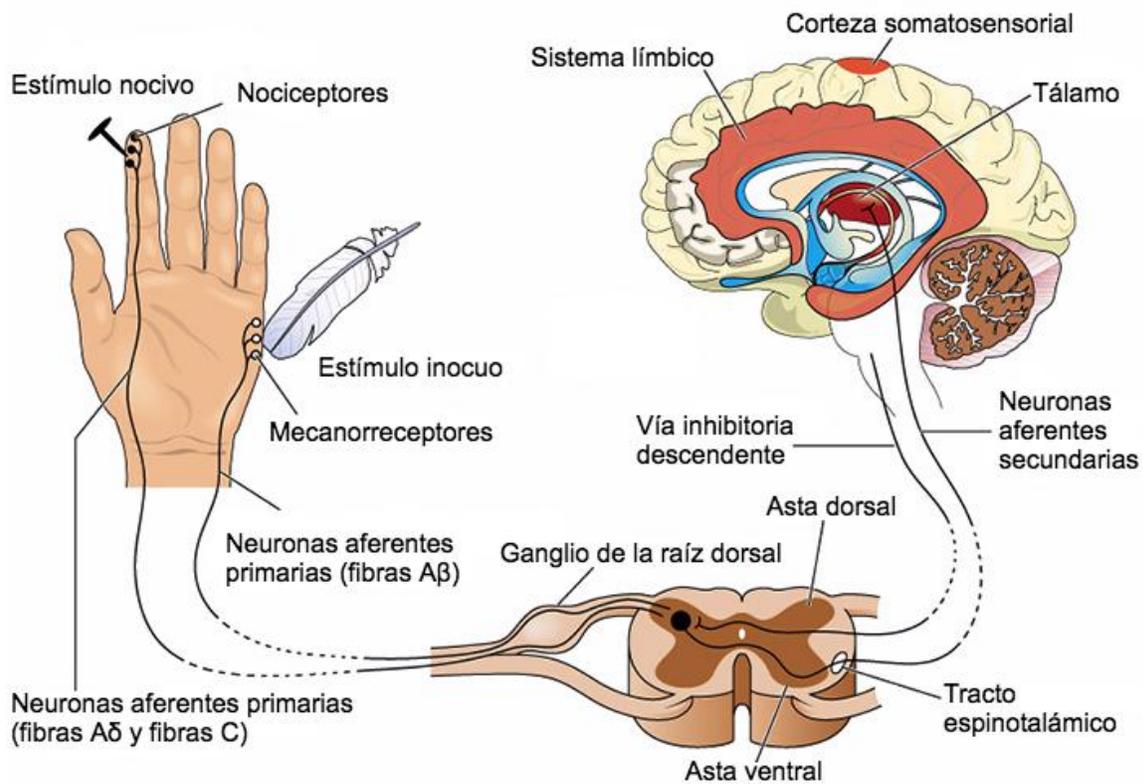
Por último, está el dolor disfuncional, éste comparte características en común con el dolor neuropático como su persistencia por períodos prolongados de tiempo y la generación de respuestas nociceptivas como la hiperalgesia y alodinia. El dolor disfuncional es mal adaptativo pues no tiene la función de proteger ni de apoyar el proceso de curación y reparación del organismo. El dolor disfuncional se debe a un mal funcionamiento del sistema somatosensorial y ocurre en situaciones en las que aparentemente no existe una inflamación o daño al sistema nervioso (Woolf, 2010).

### **3.1.2. Fisiología del dolor**

La nocicepción es el proceso fisiológico mediante el cual los nociceptores detectan los estímulos nocivos de alta intensidad y generan señales eléctricas que son transmitidas al sistema nervioso central (SNC) para ser interpretadas como dolorosas. Este fenómeno comprende los procesos de transducción, transmisión, modulación y percepción (Hyman y Cassem, 1995).

Los nociceptores son una subpoblación de fibras nerviosas periféricas cuyos somas se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) (Julius y Basbaum, 2001). La activación de los nociceptores provoca la despolarización de la neurona (potencial receptor). Si la despolarización alcanza el umbral de activación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje ( $\text{Na}_v$ ) se generan potenciales de acción que se transmiten a través de las fibras aferentes

primarias hacia las neuronas de segundo orden localizadas en el asta dorsal de la médula espinal. En la médula espinal, la señal eléctrica se inhibe o amplifica mediante modulación sináptica (McMahon y Koltzenburg, 2005; Basbaum et al., 2009). Posteriormente, la señal nociceptiva se transmite de neuronas de segundo orden a neuronas sensoriales de tercer orden localizadas en centros superiores del cerebro, donde se percibe e interpreta como una experiencia desagradable (McMahon y Koltzenburg, 2005) (Fig. 2).



**Figura 2. Activación de los nociceptores por estímulos inocuos y estímulos nocivos.** Los nociceptores se activan por estímulos físicos, térmicos y transducen la información mediante la generación de potenciales de acción. Los potenciales de acción se transducen desde las neuronas aferentes primarias a neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal. La señal nociceptiva se transmite a neuronas de tercer orden localizadas en centros supraespinales donde se integra y se da la percepción del dolor (modificada de Peter Lamb).

Existen diversos tipos de nociceptores, lo que permite al organismo diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos. De acuerdo a sus características fisiológicas, los nociceptores se clasifican en fibras A $\beta$ , fibras A $\delta$  y fibras C.

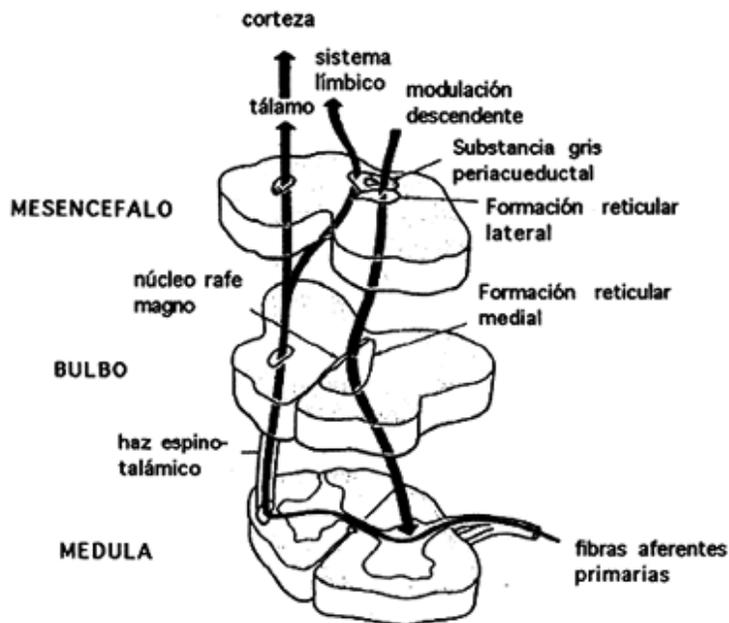
Las fibras A $\beta$  tienen un axón muy mielinizado con un diámetro aproximado de 10  $\mu\text{m}$  y una velocidad de conducción rápida entre 30 y 120 m/s (Julius y Basbaum, 2001). Su función fisiológica es la de mecanorreceptores de bajo umbral, pero en procesos patológicos pueden modificar su fenotipo y adquirir características de fibra tipo A $\delta$  de alto umbral (Costigan y Woolf, 1999).

Las fibras A $\delta$  son poco mielinizadas, de diámetro mediano (2-6  $\mu\text{m}$ ) y presentan una velocidad de conducción de entre 5 y 30 m/s. Estas fibras cuentan con dos subpoblaciones que se diferencian en su sensibilidad al calor nocivo, así como en su sensibilidad a estímulos mecánicos. Las fibras A $\delta$  tipo I responden a estímulos térmicos de alto umbral (temperaturas mayores a 50 °C o menores a los 8 °C) y a estímulos mecánicos; mientras que las fibras A $\delta$  tipo II responden a estímulos mecánicos de alto umbral y a estímulos térmicos (entre 40 y 45°C) (Basbaum y Field, 1984).

Por último, las fibras C son en su mayoría polimodales, es decir, responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Estas fibras no están mielinizadas, tienen un diámetro pequeño (0.4-1.2  $\mu\text{m}$ ) y una velocidad de conducción inferior a los 1.5 m/s. Las fibras C cuentan con dos subpoblaciones: fibras peptidérgicas y fibras no peptidérgicas. Las fibras C peptidérgicas liberan péptidos en respuesta a estímulos térmicos nocivos e inflamación, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P (SP); además, expresan al receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF) el receptor tropomiosina cinasa A (TrKa). Por otra parte, las fibras C no peptidérgicas son de respuesta más lenta y expresan al receptor purinérgico P2X3, además de un sitio de unión para isolectina (IB4) y al receptor del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Julius y Basbaum, 2001).

### 3.1.3. Vía ascendente y vía descendente del dolor

La señal nociceptiva se transmite y se modula a través de las vías ascendentes y descendentes del dolor. Las vías ascendentes transmiten el estímulo doloroso hacia el tálamo, donde se procesa y se envía a la corteza cerebral; mientras que las vías descendentes se encargan de la modulación del dolor desde los centros supraespinales del asta dorsal de la médula espinal (Steeds, 2016).



**Figura 3. Vías del dolor.** La modulación descendente comienza a nivel del mesencéfalo en estructuras como la sustancia gris periacueductal, los núcleos dorsales del rafe y la formación reticular, las cuales reciben axones provenientes de la corteza cerebral. Estas estructuras proyectan axones de forma descendente hacia los núcleos del bulbo raquídeo, que a su vez emiten axones a través del funículo dorsolateral hacia el asta posterior de la médula espinal (Modificada de Phillips y Cousins, 1986).

El asta dorsal de la médula espinal es el sitio donde ocurre la primera sinapsis de la vía ascendente del dolor, cuando las fibras aferentes primarias hacen sinapsis con neuronas de segundo orden. También es el sitio donde ocurren interacciones entre las interneuronas excitatorias e inhibitorias que modulan la transmisión del estímulo doloroso y donde ejercen su efecto los tractos inhibitorios descendentes de los centros superiores (Steeds, 2016). Las

fibras aferentes primarias inervan el asta dorsal de la médula espinal, principalmente en sus láminas superficiales (I y II) y profundas (V y VI), que junto con la lámina X constituyen las principales regiones implicadas en la recepción, procesamiento y transmisión de la información nociceptiva (Todd, 2010).

Los axones de las neuronas de segundo orden ascienden a través de diversas vías: espinoreticulares, espinomesencefálicas, espinotectales, espinohipotálamicas y espinotalámicas, para proyectar a estructuras cerebrales. Los cuerpos celulares de las neuronas de tercer orden alojados en los núcleos talámicos ascienden ipsilateralmente para terminar en la corteza somatosensorial. El tálamo es el área clave para el procesamiento de la información somatosensorial. Los axones que viajan en los tractos espinotalámico lateral y medial terminan en el núcleo lateral y núcleo medial del tálamo, respectivamente, y desde ahí a las neuronas proyectan a la corteza somatosensorial primaria y secundaria, la ínsula, la corteza cingulada anterior y la corteza prefrontal, donde el estímulo nociceptivo se percibe como doloroso (Steeds, 2016).

El sistema de modulación descendente está integrado por una serie de circuitos inhibitorios que intervienen en la modulación nociceptiva a nivel del asta dorsal de la médula espinal. Este sistema puede ser activado por distintos estímulos como el estrés, la administración de opiáceos y la estimulación eléctrica (Gebhart, 2004). La noradrenalina y la serotonina (5-HT) son los neurotransmisores clave implicados en la inhibición descendente, mientras que la sustancia gris periaqueductal (SGP) y el núcleo del rafé magno (NRM) son las estructuras clave de este sistema (Steeds, 2016).

La SGP integra señales procedentes del tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral y el tracto espinotalámico (Bandler y Keay, 1996). La SGP contiene opioides endógenos necesarios para la inducción de analgesia (Gebhart, 2004). Las neuronas de la SGP inervan a las células del NRM que contienen serotonina y establecen conexiones con la SGP y con el asta dorsal

de la médula espinal a través del fascículo dorsolateral (Gebhart, 2004). Los axones de las neuronas del NRM proyectan hacia las láminas II y III del asta dorsal de la médula espinal bloqueando la transmisión dolorosa (Steeds, 2016) (Fig. 3).

#### **3.1.4. Sensibilización**

El fenómeno de sensibilización se caracteriza por una disminución en el umbral de activación de las fibras aferentes primarias (sensibilización periférica) y de las neuronas de segundo orden que se localizan en el asta dorsal de la médula espinal (sensibilización central), lo que provoca un incremento en la generación, frecuencia y transmisión de impulsos eléctricos (Besson, 1999). El fenómeno de sensibilización explica que en presencia de un estímulo inocuo se genere una respuesta nociceptiva (alodinia) y ante un estímulo doloroso de poca intensidad se desencadene una respuesta nociceptiva exagerada (hiperalgesia) (Woolf, 2004; Latremoliere y Woolf, 2009).

La sensibilización periférica es una respuesta a la estimulación continua de las fibras aferentes primarias por factores producidos y liberados, por el propio nociceptor o por células del sistema inmune y células gliales localizadas en el tejido dañado. Los procesos inflamatorios activan a células del sistema inmune que migran al sitio de la lesión y liberan mediadores inflamatorios como citocinas proinflamatorias (interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF), quimiocinas, prostaglandinas, neurotransmisores (histamina, serotonina), bradicinina, entre otros. Además, las células dañadas también pueden liberar ATP, iones K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup>, entre otras moléculas (Basbaum et al., 2009).

Los nociceptores expresan una gran diversidad de receptores que reconocen a las moléculas de la sopa inflamatoria. La activación de estos receptores desencadena la producción de segundos mensajeros, y la activación de proteínas cinasas que fosforilan canales iónicos y receptores;

además, se induce la transcripción y transporte de canales iónicos y de receptores hacia la membrana plasmática (Scholz y Woolf, 2002). En la sensibilización periférica los canales de  $\text{Na}^+$   $\text{Na}_{v1.6}$ ,  $\text{Na}_{v1.8}$  y  $\text{Na}_{v1.9}$  migran hacia el sitio de la lesión del nervio (Tseng et al., 2014). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) incrementan su expresión en los nervios lesionados y los canales de  $\text{K}^+$  tienden a disminuir su expresión (Newton et al., 2001; Navarro et al., 2007; Aurilio et al., 2008). Aunado a esto, el umbral de activación de diversos canales disminuye como el de los canales receptores de potencial transitorio (TRP) (Waxman et al., 1999). En conjunto estos procesos provocan que las fibras aferentes primarias disminuyan su umbral de activación, de tal manera que estímulos de baja intensidad son capaces de generar una respuesta dolorosa (Basbaum et al., 2009).

Por otra parte, en la sensibilización central existen modificaciones en la citoarquitectura neuronal, una disminución del umbral de activación de las neuronas de segundo orden, alteraciones en el sistema de modulación endógena del dolor y múltiples variaciones neuroquímicas en el entorno de la lesión, entre las que destacan la liberación de glutamato, SP y CGRP (Woolf y Salter, 2000; McHugh y McHugh, 2002; Nakamura y Atsuta, 2004).

La estimulación constante de las fibras aferentes primarias produce la liberación de glutamato en la terminal central. El mecanismo clave de la sensibilización central es la activación de receptores glutamatérgicos postsinápticos. La activación de los receptores ionotrópicos a glutamato (AMPA y kainato) despolariza a la neurona postsináptica, lo que provoca el desplazamiento del ion  $\text{Mg}^{2+}$  que bloquea al receptor NMDA, con la consecuente activación de este receptor que permite la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona. La activación de los receptores a glutamato induce potenciales postsinápticos excitadores de bajo umbral cuya suma activa canales  $\text{Na}_v$ , lo que conlleva a la generación de potenciales de acción (Letremoliere y Woolf, 2009). Además, la liberación de sustancia P y CGRP de la terminal central activa a la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C

(PKC) (Basbaum et al., 2009; Letremoliere y Woolf, 2009). Todos estos cambios en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal favorecen la transmisión de las señales nociceptivas debido al aumento de la actividad eléctrica de las neuronas de segundo orden y de los mismos nociceptores (Woolf, 2004).

### 3.1.5. Papel del ion $\text{Cl}^-$ en la nocicepción

La regulación de las concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$  en los nociceptores tiene un papel fundamental en la transmisión de las señales nociceptivas y la excitabilidad neuronal (Price et al., 2009; Verkman y Galiotta, 2009). El transporte de  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana plasmática de las neuronas se lleva a cabo por los cotransportadores catión-cloruro  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (NKCC) y el  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  (KCC). En condiciones fisiológicas, el cotransportador NKCC1 incrementa las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , mientras que el cotransportador KCC2 se encarga de disminuir las concentraciones intracelulares de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Payne et al, 2003). La expresión predominante de alguno de estos dos cotransportadores define las concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$  ( $[\text{Cl}^-]_i$ ) y el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$ . Debido a esto, la actividad de NKCC1 y KCC2 es esencial para determinar si la activación de los receptores o canales iónicos permeables a  $\text{Cl}^-$  despolariza o hiperpolariza a la neurona (Price et al., 2005; Cortes-Romero et al., 2011).

Durante el desarrollo embrionario hay una mayor expresión de NKCC1 en las neuronas del sistema nervioso, lo que provoca que la  $[\text{Cl}^-]_i$  sea mayor que la extracelular ( $[\text{Cl}^-]_e$ ); debido a esto la activación de receptores como  $\text{GABA}_A$  y glicina produce una respuesta excitadora. Con la maduración del sistema nervioso aumenta la expresión de KCC2, lo que disminuye la  $[\text{Cl}^-]_i$  y provoca que la activación de los receptores  $\text{GABA}_A$  y glicina se torne inhibidora (Sung et al., 2000). Las neuronas del GRD mantienen todo el tiempo una expresión mayor del cotransportador NKCC1, debido a esto su  $[\text{Cl}^-]_i$  es mayor a

su  $[Cl^-]_e$  lo que provoca que en respuesta a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> y glicina, así como de canales iónicos permeables a Cl<sup>-</sup>, haya un eflujo de este anión y la subsecuente generación de corrientes despolarizantes (Willis, 1999, Kaneko et al., 2002).

### 3.1.6. Despolarización aferente primaria y reflejos de raíz dorsal

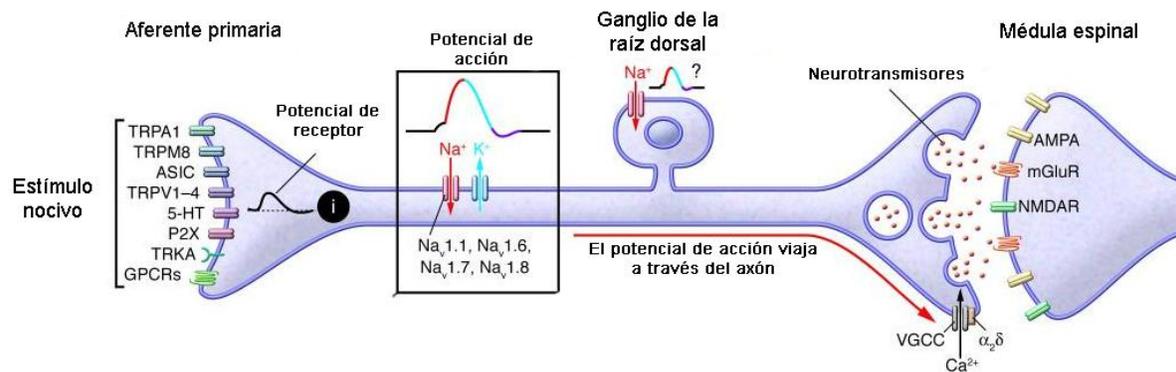
Los estímulos táctiles se perciben a través de la estimulación de fibras Aβ. La conexión entre las neuronas mecanorreceptoras y nociceptivas está dada por interneuronas GABAérgicas a nivel de la médula espinal (Laird et al., 2004). En el asta dorsal de la médula espinal los receptores GABA<sub>A</sub> están altamente expresados tanto postsinápticamente, en las neuronas de segundo orden causando hiperpolarización, como presinápticamente, en las terminales de las neuronas aferentes primarias Aδ y C (Bohlhalter et al., 1996; Laird et al., 2004). Las terminales de las aferentes primarias tienen una expresión alta del cotransportador NKCC1, por lo tanto, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> produce despolarización. Este fenómeno se conoce como despolarización de la aferente primaria (PAD, por sus siglas en inglés “*primary afferent depolarization*”). La PAD reduce la disponibilidad de los canales de Na<sub>v</sub> resistentes a tetrodotoxina presinápticos, ya que éstos se inactivan lentamente durante la estimulación sostenida de baja intensidad (Blair y Bean, 2003). Esto ocasiona que la PAD inhiba la propagación del potencial de acción y se reduzca la liberación de neurotransmisores como glutamato, en el asta dorsal de la médula espinal y por consiguiente disminuya las entradas nociceptivas a la médula espinal, generando una reducción de las sensaciones dolorosas (Laird et al., 2004; Kullmann et al., 2005). La PAD está generada principalmente por los receptores GABA<sub>A</sub>; sin embargo, otras conductancias a Cl<sup>-</sup>, como los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (CaCC) también participan en la generación de la PAD (Cho et al., 2012; Boudes y Scamps, 2012).



### 3.2. Papel de los canales iónicos en la nocicepción

Los nociceptores expresan diversos canales iónicos: canales  $\text{Na}_v$ , canales de  $\text{K}^+$ , canales de  $\text{Ca}_v$ , así como también canales TRP, canales iónicos sensibles al ácido (ASIC), canales de receptores purinérgicos (P2X), canales de cloruro activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC), entre otros. Los canales iónicos son responsables de las propiedades intrínsecas de los nociceptores, incluyendo la falta de actividad espontánea y el alto umbral de activación (Benarroch, 2015).

El proceso de nocicepción inicia con la activación de receptores y canales iónicos en las aferentes primarias, lo que permite el flujo de iones a través de ellos provocando una despolarización del potencial de membrana plasmática, llamada potencial de receptor. Esta despolarización provoca la activación de canales de  $\text{Na}_v$  generando un potencial de acción (Raouf et al., 2010). Los productos de la inflamación y del daño axonal desencadenan cambios en la expresión y función de estos canales, aumentando la excitabilidad de los nociceptores (Woolf y Ma 2007) (Fig. 5).



**Figura 5. Papel de los canales iónicos en la nocicepción.** La apertura de diversos receptores ionotrópicos en las aferentes primarias permite el flujo de iones a través de la membrana plasmática provocando un cambio en el potencial de membrana conocido como potencial de receptor. Los potenciales de receptor provocan la apertura de canales dependientes de voltaje generando potenciales de acción. Los productos de la inflamación y del daño axonal desencadenan cambios en la expresión y función de estos canales aumentando la excitabilidad de los nociceptores (Modificada de Raouf et al., 2010).

### 3.2.1. Receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1 (TRPV1)

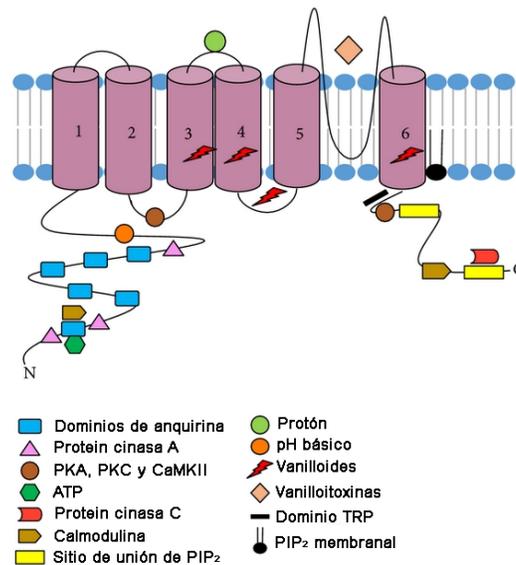
El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, que pertenece a una de las siete familias que componen a los canales TRP descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Montell y Rubin, 1989). Los canales TRP se dividen en siete familias: TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP y TRPV. A su vez, la familia TRPV se subdivide en seis miembros capaces de responder a diversos estímulos (Clapham et al., 2001).

Estructuralmente, el canal TRPV1 está formado por subunidades de seis segmentos transmembranales (TM) que se agrupan como homo y heterotetrámeros (Fig. 6). Presenta una región anfipática entre el TM5 y TM6 que constituye la región que forma el poro del canal. El poro del canal TRPV1 tiene mayor selectividad para  $\text{Ca}^{2+}$  que para otros cationes, además, contiene ácidos glutámicos involucrados en la respuesta dependiente de pH. El extremo amino terminal (N-terminal) del canal TRPV1 presenta tres dominios de anquirina encargados de mediar las interacciones proteína-proteína, y su extremo carboxilo terminal (C-terminal) contiene un sitio de unión al inositol fosfato, sitios de unión a la calmodulina y sitios de fosforilación. Ambos extremos son intracelulares (Smutzer y Devassy, 2016) (Fig. 6).

El canal TRPV1 es un integrador de estímulos nocivos que se activa, modula y antagoniza por una gran cantidad de sustancias. Sus agonistas de mayor relevancia son la capsaicina y sus análogos, como la resiniferatoxina, que es 20 veces más potente que la capsaicina; otros agonistas naturales de este canal son el alcanfor, la alicina, la anandamida, los ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs) y la N-araquidonil-dopamina (NADA). Debido a que varios agonistas de este canal son lípidos, activan los sitios de unión intracelulares del canal (Jung et al., 2002).

El canal TRPV1 también se activa por protones y óxido nítrico. Los protones, característicos de pH ácidos, provocan tanto la apertura del canal como su sensibilización. Por su parte, el canal TRPV1 se activa por el óxido

nítrico mediante una modificación en dos cisteínas presentes en su extremo N-terminal (Jara-Osegura et al, 2008).



**Figura 6. Estructura del canal TRPV1.** Diagrama que muestra las características estructurales clave en el control y regulación de la actividad de TRPV1. Cada una de las cuatro subunidades de TRPV1 es una proteína de 95 kDa que contiene seis segmentos transmembranales, un poro entre los segmentos transmembranales S5 y S6, y extremos amino terminal y carboxilo terminal intracelulares (Modificada de Smutzer y Devassy, 2016).

Se ha descrito que el canal TRPV1 se sensibiliza por la exposición prolongada a algunos de sus agonistas, efecto que es mediado por el incremento intracelular de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y por la subsecuente formación de complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que promueven su fosforilación (Caterina et al., 1997).

El canal TRPV1 está implicado en una gran variedad de procesos celulares y fisiológicos, entre los que destaca la detección de estímulos nocivos químicos y físicos. Se expresa en todos los ganglios sensitivos (GRD, ganglio trigeminal y ganglio vagal), en fibras C y A $\delta$ , en SNC e incluso en tejido no nervioso como los mastocitos, queratinocitos, músculo liso, hígado, riñón, pulmones, entre otros (Jara-Osegura et al., 2008).

La función más conocida del canal TRPV1 es la de termodetección. Un aumento en la temperatura a valores iguales o mayores de 42°C abre abruptamente el canal permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la liberación de sustancias proinflamatorias, muchas de las cuales pueden activar directamente o sensibilizar al canal TRPV1 (Jara-Osegura et al., 2008). Aunado a esto, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal TRPV1 es capaz de activar diversas cascadas celulares e incluso a otros canales iónicos como el canal anoctamina-1 (Takayama et al., 2015).

El canal TRPV1 es un modulador de la nocicepción que participa en la señalización del dolor en las aferentes primarias y en la transmisión nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal. La activación del canal TRPV1 en las terminales periféricas de las aferentes primarias induce la despolarización de la membrana, permitiendo la activación de canales  $\text{Na}_v$  y la consiguiente generación de potenciales de acción (Szallasi et al., 2007). La activación del canal TRPV1 en las terminales sinápticas de las fibras aferentes primarias a nivel del asta dorsal de la médula espinal desencadena la liberación de glutamato y neuropéptidos que actúan sobre las neuronas de segundo orden (Yang et al., 1998; Tognetto et al., 2001). Se ha descrito que la expresión del canal TRPV1 aumenta en el asta dorsal de la médula espinal durante la inflamación (Luo et al., 2004).

Los canales TRPV1 son parte importante de los mecanismos de generación y mantenimiento del dolor; son moduladores del dolor inflamatorio, neuropático y funcional. Diversos mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, la bradicinina y los protones desempeñan un papel crucial en la inducción del dolor de tipo inflamatorio; sin embargo, sólo los protones pueden activar directamente al canal TRPV1 (Tominaga et al., 1998). Su activación causa la liberación de neurotransmisores como el CGRP y la SP a partir de las aferentes primarias y de las neuronas de segundo orden, lo que produce dolor e inflamación neurogénica (Szallasi y Blumberg, 1999).

El canal TRPV1 está involucrado en el mantenimiento de la alodinia mecánica secundaria a lesiones de los nervios periféricos como la constricción crónica y la ligadura de los nervios espinales. Se sabe que en modelos de dolor neuropático la expresión del canal TRPV1 aumenta en los GRD y en el asta dorsal de la médula espinal (Kim et al., 2012; Watabiki et al., 2011; Wu et al., 2013).

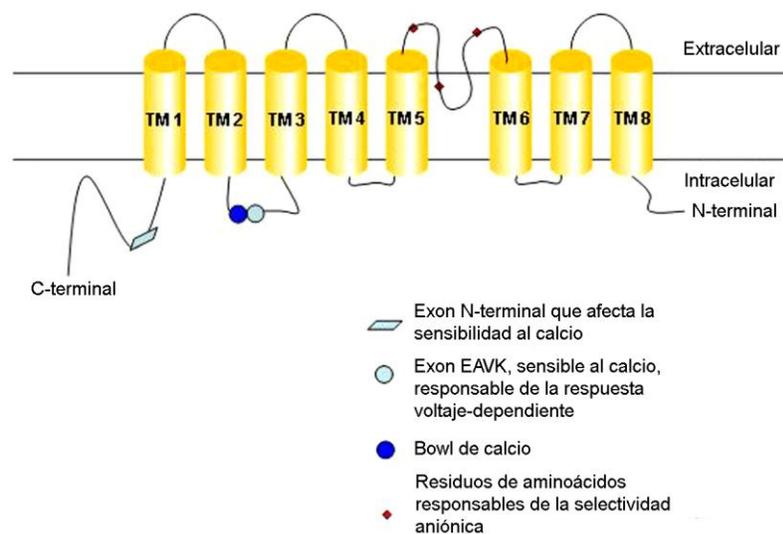
Un mecanismo clave para el desarrollo y mantenimiento del dolor es la activación de las células gliales espinales. El canal TRPV1 está involucrado en la activación de la microglía y de los astrocitos en modelos de dolor inflamatorio y de dolor neuropático (Chen et al., 2009). La activación del canal TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal induce la expresión del receptor de bradicinina, principalmente en las células de la microglía, que una vez activadas generan especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas clave en patologías dolorosas disfuncionales como la fibromialgia (Schilling y Eder 2009; Talbot et al., 2012).

### **3.2.2. Canal anoctamina-1**

El canal anoctamina-1, también conocido como TMEM16A, forma parte de la familia de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (CaCC) que consta de 10 miembros. Los CaCC se activan por la unión directa de Ca<sup>2+</sup> a un sitio específico del canal o bien por su fosforilación, mediada por cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> (Hartzell et al., 2005).

Estructuralmente anoctamina-1 es un homodímero; cada subunidad presenta 8 dominios TM con extremos N-terminal y C-terminal intracelulares. Anoctamina-1 presenta en su región N-terminal un sitio de unión para la Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina (CaM) y en sus asas intracelulares tiene múltiples sitios de regulación por fosforilación para la PKA y la PKC (Yang et al., 2008). El sensor de Ca<sup>2+</sup> de anoctamina-1 se encuentra en un asa intracelular formada entre los segmentos TM2 y TM3 (Duran y Hartzell, 2011). También entre estos dos

segmentos se encuentra una región conocida como “jaula” o “*bowl*” de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando esta región es ocupada por dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  se producen modificaciones alostéricas en la estructura del canal que provocan la apertura de su poro (Huang et al, 2012) (Fig. 7).



**Figura 7. Estructura propuesta de anoctamina-1.** Anoctamina-1 es un canal aniónico formado por 2 subunidades de 8 segmentos transmembranales. La región entre TM2 y TM3 forma la “jaula” o “*bowl*” de  $\text{Ca}^{2+}$  y es un sitio importante para la activación del canal (Modificada de Huang et al, 2012).

Los canales anoctamina-1 participan en la generación de hipersensibilidad dolorosa. En las neuronas del GRD la activación del canal anoctamina-1 produce un eflujo de  $[\text{Cl}^-]_i$  y la subsecuente despolarización de la membrana, que pueden conducir a la generación de potenciales de acción (Lee et al., 2014).

El bloqueo farmacológico de los canales CaCC reduce las conductas pronociceptivas en un modelo de inflamación crónica inducida por formalina; de igual forma, el bloqueo de canales CaCC reduce el dolor neuropático inducido por ligadura de los nervios espinales. Además, la expresión del canal anoctamina-1 aumenta tanto en la inflamación crónica inducida por formalina, como en el dolor neuropático (García et al., 2014; Pineda-Farias et al., 2015).

Aunado a esto, se sabe que las lesiones nerviosas aumentan la corriente de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas de los GRD, posiblemente por un incremento en el número de canales CaCC expresados en éstas (André et al., 2003).

En los GRD, el canal anoctamina-1 se expresa principalmente en fibras C (89%). Aproximadamente 78% de las neuronas que expresan este canal coexpresan al canal TRPV1. La interacción entre los canales anoctamina-1 y TRPV1 tiene dos componentes: una despolarización mediada por influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la activación del canal TRPV1 y una despolarización mediada por eflujo de  $\text{Cl}^-$  a través de la activación del canal anoctamina-1. La sumatoria de éstos conduce a la activación de los canales  $\text{Na}_v$ , y por tanto, a la generación de potenciales de acción y la subsecuente liberación de glutamato (Takayama et al., 2015).

A pesar de que el papel de los canales iónicos TRPV1 y anoctamina-1 en el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa ha sido ampliamente estudiado, su influencia en los estados pronociceptivos inducidos por privación de sueño no se conoce.

### **3.3. Sueño y dolor**

#### **3.3.1. Ciclo del sueño**

El ciclo del sueño es un fenómeno fisiológico de patrones cíclicos de actividad cerebral que permite la recuperación del organismo después del período de vigilia. Éste se divide en dos: sueño de onda lenta o sueño no-MOR y sueño paradójico o sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). Durante la noche el cerebro atraviesa varias veces todas las etapas del sueño no-MOR y MOR con períodos de MOR cada vez más largos y profundos conforme se acerca la mañana (NIH, 2017).

El sueño no-MOR o sueño sincronizado se caracteriza por una disminución paulatina en la actividad electroencefalográfica y consta de tres fases.

Fase 1: período corto de sueño ligero con una duración de varios minutos durante el cual se pasa del estado de vigilia al estado de sueño. Se caracteriza por una disminución en las ondas cerebrales y una disminución en el patrón respiratorio y los latidos cardíacos, se presenta relajación muscular y espasmos ocasionales.

Fase 2: es la etapa la más larga del ciclo del sueño. Se caracteriza por una reducción en la actividad cerebral con breves estallidos de actividad eléctrica. En esta etapa se reducen aún más la respiración, los latidos cardíacos y el tono muscular.

Fase 3: es el período de sueño profundo. Se caracteriza porque las ondas cerebrales se vuelven aún más lentas, los músculos están relajados y los latidos cardíacos y la respiración alcanzan sus niveles más bajos (NIH, 2017, McCarley, 2007).

El sueño MOR ocurre al final del ciclo del sueño y tiene una duración aproximada de 90 minutos en el humano y de 12 minutos en la rata (Steriade y McCarley, 1990). Se caracteriza por movimientos oculares aleatorios y rápidos que se acompañan de una disminución en el tono muscular, conocida como atonía del sueño MOR. Además, esta fase se caracteriza por ser aquella en la que tienen lugar la mayor parte de los sueños vívidos y procesos como el almacenamiento de la memoria y la regulación del estado de ánimo y del aprendizaje (Aserinsky y Kleitman, 1953; Dement, 1965). El sueño MOR representa aproximadamente el 25% del total del sueño en los mamíferos. En el sueño MOR la actividad cerebral es similar a la que ocurre durante el estado vigilia, por lo que también se conoce como sueño paradójico o sueño desincronizado. Además, los patrones de respiración y latidos cardíacos son similares a los presentes en el estado de vigilia (McCarley, 2007).

La atonía que se observa en el sueño MOR se debe a la inhibición de las neuronas motoras, lo que se debe a que durante esta fase las motoneuronas de el asta ventral de la médula espinal se encuentran en un estado de hiperpolarización debido a liberación de GABA y glicina, así como a una baja actividad de los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica (Hoshino y Pompeiano, 1976; Mileykovskiy et al., 2000).

### **3.3.2. Privación de sueño**

La privación de sueño es un estado en el que el sueño es insuficiente para que en la vigilia se mantengan un estado de alerta, un rendimiento y una salud adecuados. La privación de sueño se debe a la reducción del tiempo total de sueño (disminución de la cantidad) o la fragmentación del sueño por breves despertares (disminución de la calidad) (Cirelli, 2018).

Existen diversos tipos de privación de sueño (Tononi, 2005):

- Privación parcial a corto plazo, en la que los individuos se someten a una privación de entre 24 y 45 h.
- Privación total de sueño, en la que hay más de 45 h de privación de sueño.
- Privación parcial crónica, en la que se considera que se duerme menos de 7 h cada 24 h, de manera prolongada.
- Privación selectiva del sueño: a) Privación sueño tipo MOR, b) privación de sueño no MOR.

La mayoría de los estudios de privación de sueño han sido realizados en animales. En humanos los estudios de privación de sueño no sobrepasan los 7 días por razones éticas. Los efectos de la privación de una o dos noches de sueño producen somnolencia y fatiga al día siguiente, disminución de la capacidad de atención y concentración y mayor vulnerabilidad para los accidentes (Finan et al., 2013).

La privación del sueño produce múltiples alteraciones en la homeostasis del organismo (Tabla 1). Las alteraciones del sueño pueden ser agudas o crónicas y está reportado que pueden producir alteraciones en los procesos cognitivos (Stickgold y Walker, 2007; Volkow et al 2009), la ingesta alimentaria (Koban et al, 2008) y la nocicepción, entre otras. Incluso se ha reportado que en animales sometidos a privación de sueño por varias horas al día durante semanas, que ésta puede inducir la muerte (Rechtschaffen y Bergmann, 1995).

**Tabla 1. Efectos asociados a la privación de sueño.** Modificado de Kumar y Chanana, 2014.

<b>Fisiología afectada</b>	<b>Características</b>
Conducta	Reducción en la actividad motora. Aumento en los comportamientos exploratorio, de lucha y de roer.
Hormonal	Depleción en los niveles de triyodotironina y tiroxina. Aumento en la liberación de corticotropina en el cuerpo estriado, sistema límbico e hipófisis y decremento en el hipotálamo. Alteración en la liberación de melatonina y hormona del crecimiento.
Liberación de neurotransmisores	Aumento en la expresión de receptores D2 en el cerebro. Disminución en los niveles de acetilcolina e incremento en la acetilcolinesterasa. Aumento en los niveles de GABA en la corteza cerebral, tronco encefálico e hipotálamo.
Metabólico	Aumento del metabolismo sistémico. Disminución en la liberación de leptina, aumento en la liberación de grelina y disminución en la sensibilidad a la insulina. Disrupción total de la homeostasis del apetito. Riesgo de diabetes mellitus tipo 2.
Estrés oxidativo	Aumento de la peroxidación lipídica y de los niveles de nitrito. Disminución en los niveles de glutatión y catalasa.
Respuestas inmune y metabólica	Aumento en los niveles diurnos de citocinas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Disminución de la resistencia a enfermedades infecciosas.

### **3.3.3. Efecto de la restricción de sueño en la nocicepción**

La intensidad y duración del dolor aumenta por diversos factores entre los que se encuentran los trastornos en el ciclo del sueño, llegando incluso a provocar una incapacidad funcional en los pacientes (Souza y Silva., 2004). Se ha descrito que el dolor patológico a menudo está asociado con sueño insuficiente, que a su vez es un predictor de persistencia de síntomas dolorosos (Finan et al., 2013).

El dolor crónico afecta al 20-35% de la población mundial (Souza y Silva, 2004) y se estima que entre un 50-70% de los pacientes con dolor moderado a intenso sufren trastornos del sueño asociados a despertares nocturnos por dolor, dificultad para quedarse dormido y sueño no reparador (Morin et al., 1998; Smith et al., 2000; Moldofsky, 2001; Wilson et al., 2002; Okifuji y Hare 2011; Mencías-Hurtado y Rodríguez-Hernández, 2012).

Diversos estudios experimentales y poblacionales han demostrado la relación entre el sueño insuficiente y el aumento de la sensibilidad al dolor (Onen et al. 2001; Roehrs et al., 2006; Odegard et al., 2015). El aumento en la cantidad de sueño o la mejora de su calidad reduce la sensibilidad al dolor, lo que sugiere una relación bidireccional entre el sueño y el dolor (Roehrs et al., 2012; Vitiello et al., 2014). Sin embargo, los mecanismos involucrados en esta relación no se conocen del todo.

Anormalidades en la modulación central del dolor pueden ser una vía a través de la cual la deficiencia de sueño contribuye a la hipersensibilidad observada en el dolor crónico (Yarnitsky, 2010). La disrupción experimental del sueño altera los mecanismos inhibitorios del dolor (Smith et al., 2007). Trastornos del sueño como el insomnio se han asociado con una ausencia de la modulación inhibitoria central del dolor (Haack et al., 2012). La habituación a estímulos nocivos no amenazantes, proceso relacionado con la modulación inhibitoria central, se reduce o está ausente en desórdenes dolorosos crónicos (Flor et al., 2004; Bingel et al., 2007). Estos datos sugieren que un sueño insuficiente juega un rol importante en los procesos fisiológicos que controlan la vulnerabilidad al dolor patológico.

El procesamiento del dolor y el ciclo del sueño son dos entidades estrechamente relacionadas que comparten vías anatómicas y funcionales. La relación existente entre éstos es directa y recíproca de tal manera que el dolor puede llegar a producir mala calidad del sueño y la falta de sueño incrementa la intensidad de la percepción del dolor (Haythornthwaite et al., 1991; Mencías-Hurtado y Rodríguez-Hernández, 2012; Finan et al., 2013).

El ciclo sueño-vigilia se controla por un balance que resulta de la inhibición recíproca entre el sistema activador reticular ascendente (SARA; noradrenérgico, serotoninérgico, colinérgico y orexinérgico) y el sistema promotor del sueño del núcleo preóptico ventrolateral (POVL), cuyas neuronas secretan GABA y galanina (Schwartz y Roth, 2008). Este equilibrio se logra mediante un asa de retroalimentación. Durante la vigilia, los núcleos monoaminérgicos generan potenciales de acción que inhiben a las neuronas del núcleo POVL. Al contrario, durante el sueño las neuronas del núcleo POVL tienen una actividad vigorosa que bloquea la acción de las neuronas monoaminérgicas (Gallopín et al., 2000). Las manifestaciones patológicas de la privación del sueño son resultado de la alteración en la homeostasis de este circuito.

Se ha reportado que la privación de sueño tiene efectos hiperalgésicos y puede interferir con la efectividad de tratamientos analgésicos relacionados con los sistemas serotoninérgico y opioide. La privación del sueño MOR (PMOR) incrementa la sensibilidad nociceptiva a estímulos mecánicos, térmicos y eléctricos, pero no a estímulos químicos (Onen et al., 2001b). La hiperalgesia inducida por disrupción del sueño se debe a que el procesamiento del dolor y el ciclo del sueño comparten vías de modulación.

En modelos de PMOR la síntesis de opioides se inhibe (Shapiro y Girdwood, 1981) y hay una reducción de la afinidad de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  (Fadda et al., 1991). Además, el efecto de potenciación analgésica de los opioides, mediado por inhibidores de la encefalinasa, inhibidores de la monoaminooxidasa B (MAO-B) e inhibidores de sustratos de la MAO-B, se anula en animales sometidos a PMOR (Ukponmwan et al., 1986).

Se ha reportado que ratas sujetas a privación de sueño presentan niveles menores de serotonina en distintas regiones cerebrales. La serotonina es un neurotransmisor clave en la modulación del dolor (Farooqui et al., 1996; Bjorvatn et al., 2002). Aunado a esto, se sabe que durante la privación del sueño, los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>2C</sub> facilitan la sensibilidad a estímulos

mecánicos (Wei et al., 2008). Otras moléculas como la D-aminoácido oxidasa, el óxido nítrico y el glutamato están involucradas en los mecanismos facilitadores del dolor espinal que contribuyen a la hipersensibilidad mecánica inducida por privación de sueño (Wei et al., 2007; Wei et al., 2013).

La adenosina promueve el sueño y se considera el principal neurotransmisor involucrado en la homeostasis del sueño-vigilia. En el cerebro, el nivel de adenosina aumenta durante la vigilia sostenida y disminuye durante el sueño (Benington et al., 1995). Además, se ha reportado que la activación del receptor de adenosina produce analgesia. Se ha propuesto que los efectos analgésicos de la morfina pueden atribuirse en parte a que ésta induce la liberación de adenosina (Ribeiro et al., 2002).

Aunque no se ha descrito si los canales TRPV1 participan en la hipersensibilidad dolorosa inducida por la privación de sueño, sí se conoce que el canal TRPV1 tiene un papel relevante en la hipersensibilidad dolorosa inducida por estrés. La PMOR tiene en sí misma un componente de estrés. En ratas con privación de sueño hay un aumento de la unión de los receptores para la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y aumento en la concentración de hormona adrenocorticotropa en distintas áreas cerebrales (ACTH), así como pérdida de peso corporal y aumento en el tamaño de la glándula suprarrenal (Coenen y Luijtelaar, 1985; Patchev et al., 1991; Fradda et al., 1997). La expresión del canal TRPV1 en el sistema nervioso aumenta en respuesta al estrés y se sabe que los antagonistas de este canal revierten el déficit conductual inducido por estrés en ratas (Socała y Wlaź, 2016). Aunado a esto, se ha reportado que la activación del canal TRPV1 activa los receptores de glucocorticoides a través de la PKC (Gunthorpe y Chizh, 2009).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La privación de sueño es un problema de salud asociado a distintas patologías. Existe una estrecha relación entre los sistemas que regulan el ciclo del sueño y el dolor; sin embargo, las alteraciones fisiológicas que participan en el desarrollo de la hipersensibilidad dolorosa inducida por privación del sueño aún no han sido del todo elucidadas.

Dado que la restricción de sueño MOR tiene en sí misma un componente de estrés y a que se ha descrito que el canal TRPV1 tiene un papel relevante en la hipersensibilidad dolorosa inducida por estrés, es posible que este canal participe en la sensibilidad al dolor observada en la restricción de sueño MOR. Por otra parte, hasta ahora no se ha descrito que el canal anoctamina-1 participe en la hipersensibilidad dolorosa inducida por estrés o privación de sueño; sin embargo, dada su importancia en la generación de conductas nociceptivas es interesante conocer si el canal anoctamina-1 participa en la sensibilización al dolor asociada a la privación de sueño MOR.

#### **5. HIPÓTESIS**

Los canales TRPV1 y anoctamina-1 participan en la generación de la alodinia presente en ratas con privación de sueño MOR.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Evaluar el papel de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la generación de la alodinia táctil observada en ratas con privación de sueño MOR.

### 6.2. Objetivos particulares

- Replicar el modelo de plataformas múltiples para la restricción de sueño MOR en ratas de la cepa Wistar.
- Determinar la efectividad de fármacos analgésicos utilizados para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático, así como de un inductor del estado de alerta, sobre la alodinia táctil inducida por la restricción de sueño MOR.
- Determinar farmacológicamente el papel de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por la privación de sueño MOR.
- Determinar, mediante *Western-blot*, si la privación de sueño MOR modifica la expresión proteica de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en el asta dorsal de la médula espinal y en los GRD de la rata.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Materiales

#### 7.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 180-200 gr. Adicionalmente se utilizó un grupo con machos para descartar posibles variaciones significativas debido al género. Los animales se obtuvieron del bioterio del Cinvestav Sede Sur y se mantuvieron con acceso libre a alimento y agua, a una temperatura ambiente de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , así como un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Los experimentos se realizaron siempre de acuerdo con las directrices de estándares éticos para la investigación del dolor en animales (Zimmermann, 1983). El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 y el protocolo para uso de animales se aprobó por el comité interno del Cinvestav (#009214). Al término de los experimentos los animales se sacrificaron en una cámara de  $\text{CO}_2$ .

#### 7.1.2. Fármacos

La indometacina (Sigma; Missouri, EUA) se disolvió en bicarbonato de sodio 1M ( $\text{NaHCO}_3$ ) y se preparó en fresco para cada uso. La morfina se utilizó directamente del stock (1 mg/ml) sin diluir. La gabapentina (Merck; Darmstadt, Alemania) se disolvió en solución salina al 0.9% y se preparó en fresco para cada uso. La cafeína (Sigma; Missouri, EUA) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y se mantuvo en stock (20 mg/ml). El 3,6-Dihidro-3'-(trifluorometil)-N-[4-[(trifluorometil)sulfoil]fenil]-[1(2H),2'-bipiridina]-4-carboxamida (A-784168; Tocris; Bristol, Reino Unido), el 2-[(5-etil-1,6-dihidro-4-metil-6-oxo-2-pirimidinil)tio]-N-[4-(4-metoxifenil)-2-tiazolil]acetamida (T16A<sub>inh-A01</sub>; Tocris; Bristol, Reino Unido) y el N-((4-metoxi)-2-naftil)ácido-5-nitroantranílico

(MONNA; Sigma; Missouri, EUA), se disolvieron en DMSO al 100%, al 30% y al 100% respectivamente y se mantuvieron en stock (695.3  $\mu$ M, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l y 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, respectivamente), a una temperatura de -20 °C para su almacenamiento. La administración de indometacina, gabapentina y cafeína se realizó por vía oral (v.o.). La morfina por vía subcutánea (s.c.). El A-784168, el T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA se administraron por vía intratecal (i.t.) en un volumen final de 10  $\mu$ l (Tabla 2).

**Tabla 2.** Vías de administración y dosis de los fármacos utilizados.

Vía oral (v.o.), subcutánea (s.c.) e intratecal (i.t.).

Fármaco / Vía	Dosis
Indometacina / v.o.	1, 10 mg/kg
Gabapentina / v.o.	100, 300 mg/kg
Morfina / s.c.	1, 10 mg/kg
Cafeína / i.p.	1, 10, 30 mg/kg
A784168 / i.t.	0.48, 4.8, 48 ng
T16A <sub>inh-A01</sub> / i.t.	0.1, 1, 10 $\mu$ g
MONNA / i.t.	1, 10, 100 $\mu$ g

## 7.2. Métodos

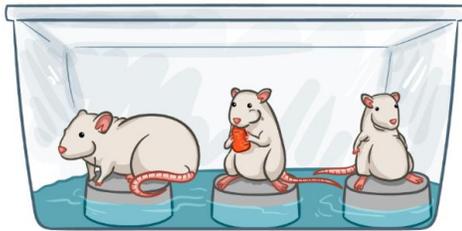
### 7.2.1. Privación de sueño de movimientos oculares rápidos (PMOR)

La interrupción selectiva del sueño MOR se realizó utilizando el modelo de plataformas múltiples. Los animales se colocaron en una caja de experimentación de 82 cm x 59 cm x 48 cm que cuenta con 6 plataformas de un diámetro de 6.5 cm y agua hasta aproximadamente 1 cm por debajo de éstas (Fig. 8A). Los animales control permanecieron todo el tiempo en cajas con aserrín y se les permitió dormir libremente (Fig. 8B) (Van Hulzen y Coenen, 1981).

Todos los experimentos se realizaron en la misma habitación para procurar que las condiciones ambientales fueran las mismas para todos los

animales. Las ratas se colocaron por lapsos de 1 h diaria dentro de la caja de experimentación sin agua para que exploraran libremente y se habituaron dos días previos a la PMOR. Durante los experimentos se colocaron 4 ratas en la caja de experimentación con la intención de dejar dos plataformas libres para que los animales pudieran cambiarse de plataforma y reducir el estrés por inmovilidad (Van Hulzem y Coenen, 1981).

**A)**



**B)**



**Figura 8. Esquema de la caja de experimentación para la PMOR. A)** Para cada serie experimental se colocaron 4 ratas por caja y el nivel de agua se estableció 1 cm por debajo de las 6 plataformas que tiene la caja. **B)** Los animales control se mantuvieron en una caja con aserrín.

### 7.2.2. Evaluación de la nocicepción mecánica

La alodinia táctil se evaluó utilizando filamentos de Von Frey (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) mediante la determinación del 50% del umbral de retirada de la pata usando el método “Up & Down” (Dixon, 1980). Las evaluaciones comenzaron con el filamento de un peso de pandeo de 2 g (3.41 milliNewtons) y se aplicó el estímulo sobre la superficie plantar de la pata con una presión suficiente para que el filamento se pandeara. La retirada de la pata se interpretó como respuesta positiva y se prosiguió a evaluar con el siguiente filamento más liviano, mientras que la ausencia de retirada de la pata después de 5 segundos de estímulo continuo se interpretó como una respuesta negativa, por lo que se prosiguió con el uso del siguiente filamento más

pesado. Las puntuaciones resultantes se utilizaron para calcular el 50% del umbral de respuesta utilizando la fórmula:

$$\mathbf{50\% \text{ g umbral} = 10^{(X_f + k\delta)} / 10,000}$$

Donde:

X<sub>f</sub> = valor del último filamento von Frey utilizado en unidades logarítmicas

k = el valor de la tabla publicada por Dixon (1980) para el patrón de respuestas positivas y/o negativas

δ = la diferencia de media en unidades logarítmicas del último filamento utilizado.

Se consideró que la rata presentaba alodinia cuando los umbrales de retirada de la pata fueron inferiores a 5 g.

### **7.2.3. Determinación de la expresión de las proteínas por *Western-blot*.**

#### **7.2.3.1. Extracción de tejidos y obtención de proteínas totales**

Los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajo la médula espinal mediante presión hidráulica. Se disecó la porción dorsal de la médula espinal que correspondió a la región lumbar L4-L6 y los GRD L4-L6 de ambos lados de la médula espinal. Cada muestra de médula espinal y GRD correspondió al tejido de una sola rata. Las muestras se guardaron a -70 °C para su procesamiento posterior. Los tejidos se homogenizaron con buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl pH 7.5, EDTA 5 mM) adicionado con Tritón X-100 al 1% e inhibidores de proteasas a una dilución 1:1000 de las soluciones stock (aprotinina 2 mg/ml, leupeptina 2 mg/ml, pepstatina 10 mg/ml, PMSF 100 mM) hasta obtener una suspensión. Durante el proceso de

manipulación, los tejidos se mantuvieron a 4 °C (baño de hielo). La suspensión celular se centrifugó a 13,500 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante, el cual se almacenó en alícuotas de 40 µL cada una a -70 °C.

#### **7.2.3.3. Cuantificación de proteínas totales**

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford (BIO RAD). Para ello se realizó una curva estándar de  $\gamma$ -globulina. Las muestras obtenidas de GRD y médula espinal se diluyeron 1:100 en buffer RIPA con inhibidores de proteasas y se agregó a cada muestra 1 ml de agente colorante (previamente diluido en agua destilada en una proporción 1:5). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se midió su absorbancia a 595 nm. Los valores de concentración de las muestras de GRD y médula espinal se extrapolaron con el ajuste lineal de la curva estándar obtenida.

#### **7.2.3.4. Western-blot**

La electroforesis de 50 µg de proteínas totales se realizó en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Para ello se preparó un gel de poliacrilamida al 10% (41% agua, 25% Tris-HCl a 1.5 M, 33% acrilamida/bis, 1% SDS, 0.5% persulfato de amonio y 0.05% TEMED; pH 8.8). Cuando dicho gel solidificó se preparó sobre éste el gel concentrador de poliacrilamida al 5% (57% ddH<sub>2</sub>O, 25% Tris-HCl a 0.5 M, 17% acrilamida/bis, 1% SDS, 0.5% persulfato de amonio y 0.05% TEMED; pH 6.8).

La preparación de las muestras para colocar en el gel consistió en tomar 50 µg de proteína total de cada sobrenadante ajustando a un volumen de 10 µL con buffer de lisis. A cada muestra se le adicionó 10 µl de buffer de muestra 2x (62.5 mM de Tris-HCl, 25% de glicerol, 2% de SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol) para obtener un volumen final de 20 µl. Las muestras se hirvieron a 95 °C durante 2 minutos y posteriormente se centrifugaron brevemente a temperatura ambiente. Finalmente, los 20 µl se cargaron en el gel. Adicionalmente en cada

gel se colocaron 3  $\mu$ L del marcador de peso molecular (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

El gel se colocó en la cámara de electroforesis con buffer de corrida frío (25 mM Tris, 190 mM glicina y 0.1% SDS; pH 8.3). La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 60 mV al inicio y de 120 mV cuando las muestras se encontraban en el gel resolviendo. Las proteínas embebidas dentro del gel se electrotransferieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada durante 5 minutos en metanol. La electrotransferencia se llevó a cabo por 90 minutos a 70 mV en buffer de transferencia (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 0.01% de SDS). Al término de ésta la membrana se bloqueó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.4) con 0.1% de tween-20 (PBS-T) y 5% de leche descremada, durante 2 h a temperatura ambiente.

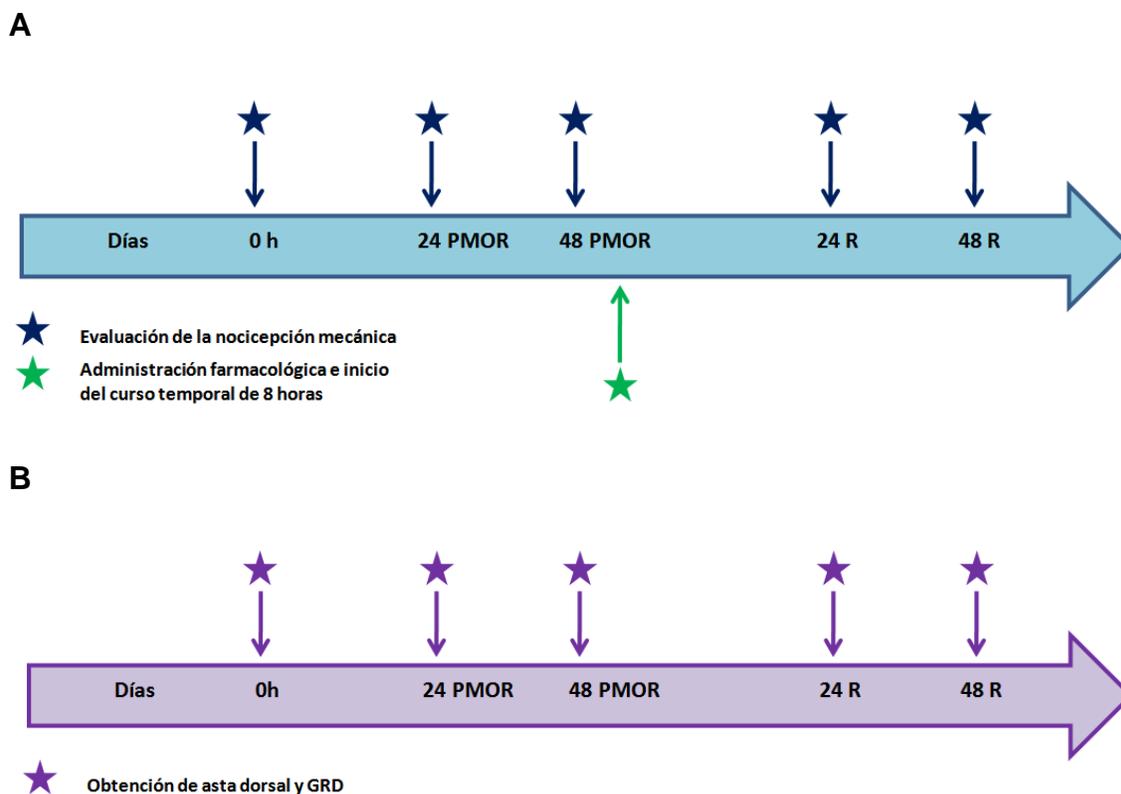
Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios previamente diluidos en la solución de bloqueo: 1:500 anti-TRPV1 producido en ratón (cat. sc-398417, Santa Cruz), 1:300 anti-anoctamina-1 producido en conejo (cat. ACL-011, Alomone), 1:300 anti-ATF3 producido en conejo (cat. sc-188, Santa Cruz) y 1:5,000 para anti-actina producido en ratón (cat. MAB1501R Chemicon). La membrana se incubó 12 h a 4° C para el caso del anticuerpo anti-TRPV1, 36 h a 4° C para el anticuerpo anti-anoctamina-1, 48 h a 4° C para el anticuerpo anti-ATF3 y 2 h para el anticuerpo anti-actina. Después de incubar con el anticuerpo primario la membrana se lavó en tres ocasiones con PBS-T durante 10 minutos cada una. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario respectivo acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP), durante 2 h a temperatura ambiente, el cual se diluyó en la solución de bloqueo 1:2,500 contra ratón IgG-HRP (cat. sc-2371, Santa Cruz) o 1:3,000 contra conejo IgG-HRP (cat. sc-2370, Santa Cruz). Transcurrido el período de incubación, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con PBS-T.

La señal del anticuerpo se reveló mediante el kit de quimioluminiscencia *Immobilon Western* (Millipore; Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente, la señal quimioluminiscente se detectó mediante un sistema *C-DiGit Blot scanner* (LICOR, Nebraska). La cuantificación de la señal de los *blots* se llevó a cabo mediante el programa *Image Studio Lite 5.2*. La densidad de las bandas obtenidas con el anticuerpo para TRPV1, anoctamina-1 o ATF3 se normalizó con su respectiva señal de actina.

#### **7.2.4. Diseño experimental**

La alodinia mecánica se evaluó en ambas patas traseras antes de introducir a los animales dentro de la caja de experimentación (basal) y después de 24 y 48 h de privación de sueño MOR, así como a las 24 y 48 h posteriores a la privación de sueño MOR para evaluar su recuperación. Por otra parte, a ratas con 48 h de privación de sueño MOR se les administraron los fármacos y la alodinia táctil se evaluó a los 30 minutos, a la hora y posteriormente cada hora hasta completar 8 h (Fig. 9A).

Para evaluar el efecto de la privación de sueño MOR sobre la expresión de los canales TRPV1 y anoctamina-1, así como del marcador de daño neuronal ATF3, se llevó a cabo la detección de dichas proteínas mediante *Western-blot*. Se establecieron 5 grupos de 4 ratas cada uno: *naïve*, 24 y 48 h de privación de sueño MOR, 24 y 48 h de recuperación posteriores a 48 h de privación de sueño MOR (Fig. 9B).



**Figura 9. Diseño experimental A)** Curso temporal para la evaluación de la alodinia mecánica. **B)** Curso temporal para la obtención de tejidos. Privación de sueño MOR por 24 y 48 h (24 PMOR y 48 PMOR, respectivamente). Y 24 y 48 h de recuperación posterior a la PMOR por 48 h (24 R y 48 R, respectivamente).

### 7.2.5. Análisis estadístico

Para todos los tratamientos farmacológicos se emplearon grupos con una  $n=6$ . El análisis de los resultados se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de la prueba de Student Newman-Keuls (SNK). Para el análisis entre dos grupos se empleó la prueba de t de Student. Para los estudios de expresión de proteínas se empleó una  $n = 4$ . El análisis de los resultados se realizó empleando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de SNK. Se consideró como significativa una  $P < 0.5$ .

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Replicación del modelo de plataformas múltiples para la PMOR en ratas**

#### **8.1.1. Curso temporal de la alodinia inducida por PMOR**

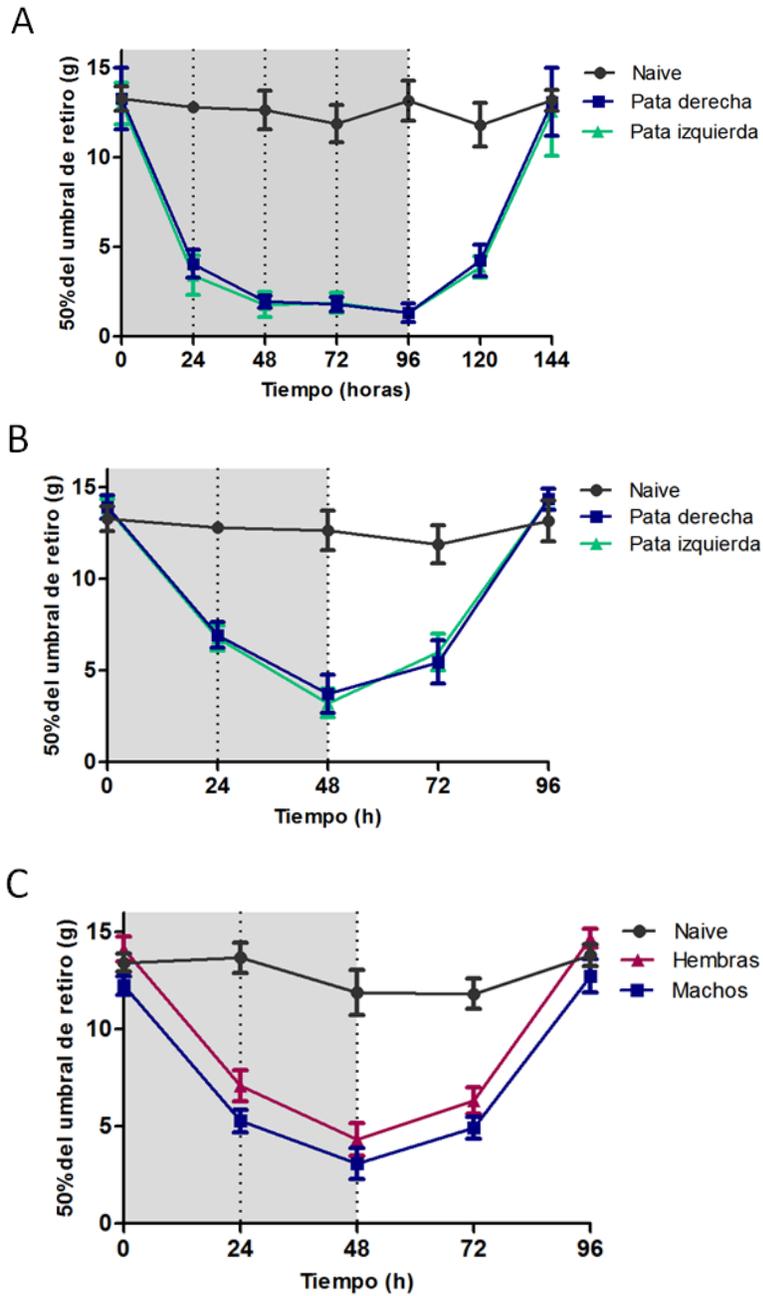
La privación de sueño MOR (PMOR) indujo alodinia táctil en ratas hembras de la cepa Wistar. Este efecto se observó desde las 24 h posteriores a la PMOR y se estableció a su nivel máximo con 48 h de PMOR. Este efecto fue constante durante las 96 h que se mantuvo a las ratas con PMOR (Fig. 10A).

Por lo tanto, para los experimentos posteriores se realizó una PMOR por 48 h debido a que a este tiempo la alodinia estaba establecida y a que a partir de 72 h el estado general de los animales comenzaba a deteriorarse. La PMOR por 48 h induce alodinia generalizada, ya que se observó la conducta de alodinia en ambas patas de la rata (Fig. 10B). Además, se observó que 48 h de recuperación de sueño son suficientes para que los umbrales de nocicepción mecánica regresen a niveles basales.

#### **8.1.2. El género no modifica la alodinia mecánica inducida por PMOR**

Para determinar si existían diferencias entre machos y hembras en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la PMOR se realizó un grupo experimental con ratas macho a los que se les expuso a 48 h de PMOR.

Los resultados obtenidos en ratas macho con PMOR de 48 h no mostraron diferencias significativas con los obtenidos en ratas hembra, descartando diferencias en el modelo ligadas al género (Fig. 10C).



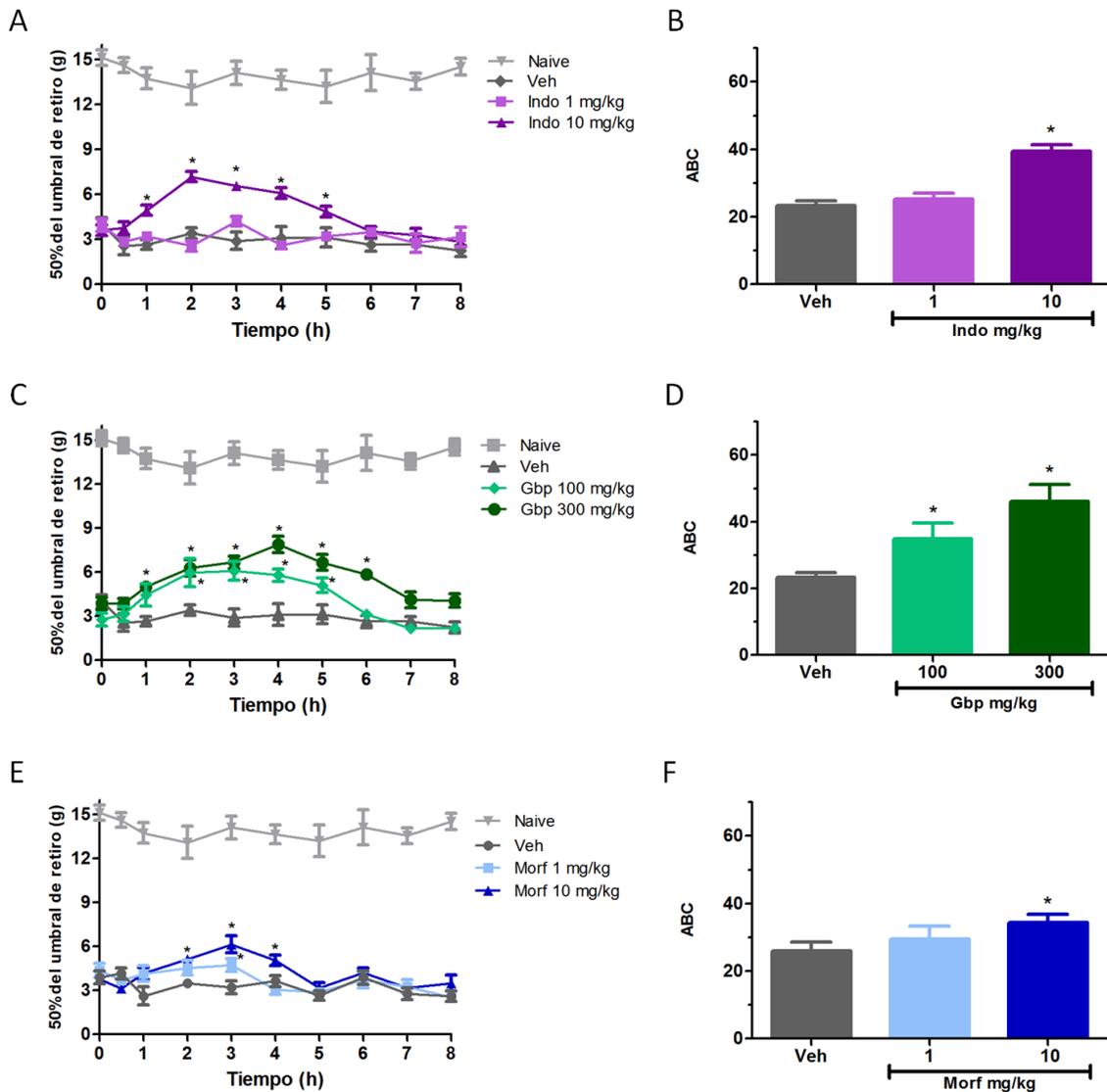
**Figura 10. Curso temporal de la alodinia táctil inducida por PMOR. A)** PMOR por 96 h en ratas hembras de la cepa Wistar. **B)** PMOR por 48 h en ratas hembras. **C)** PMOR por 48 h en ratas hembra y macho. Los datos se muestran como el 50% del umbral de retiro de la pata en respuesta a la aplicación de filamentos de von Frey. \*P < 0.05 vs grupo *naive* por ANOVA de una vía seguida de SNK. n=6.

## **8.2. Determinación de la efectividad de fármacos analgésicos utilizados para el tratamiento del dolor sobre la alodinia táctil inducida por PMOR**

La administración de indometacina, un fármaco utilizado para el tratamiento del dolor inflamatorio, a la dosis de 10 mg/kg, pero no de 1 mg/kg, ni el vehículo (DMSO 0.1%), disminuyó modestamente la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. La indometacina tuvo su mejor efecto antialodínico 2 h después de su administración y perduró por aproximadamente 3 h. Sin embargo, su efecto analgésico fue modesto ya que las ratas presentaron un umbral de retiro de la pata en valores de cercanos a 7 g (Fig. 11A y 11B).

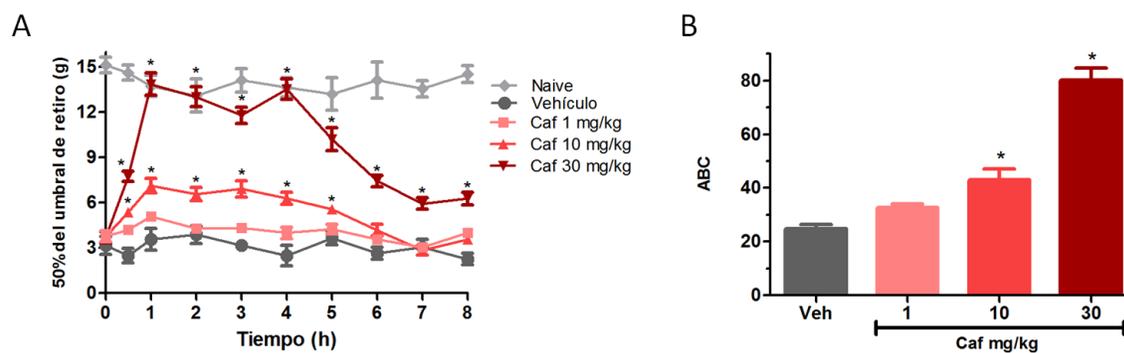
La administración de gabapentina, fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento del dolor neuropático y funcional, a las dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg, disminuyó de manera dosis dependiente la alodinia táctil inducida por PMOR teniendo su efecto máximo a las 4 h posteriores a la administración de la dosis de 300 mg/kg. Al igual que lo observado con la indometacina, el efecto analgésico de gabapentina fue modesto ya que las ratas presentaron un umbral de retiro de la pata en valores de cercanos a 7 g (Fig. 11C y 11D).

La administración de morfina, un fármaco utilizado en el tratamiento de dolor crónico disminuyó modestamente pero de manera estadísticamente significativa, la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR a la dosis de 10 mg/kg. El efecto antialodínico de esta dosis de morfina alcanzó su efecto máximo 3 h después de su administración. La administración de 1mg/kg de morfina o el vehículo (DMSO 0.1%) no tuvo efecto antialodínico (Fig. 11E y 11F).



**Figura 11. Efecto de fármacos analgésicos utilizados para el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático sobre la alodinia táctil inducida por PMOR. A, C y E) Curso temporal del efecto de indometacina (Indo), gabapentina (Gbp) y morfina (Morf) respectivamente, sobre la alodinia táctil producida por 48 h de PMOR en ratas. Los datos se expresan como el 50% del umbral de retiro de la pata en respuesta a la aplicación de filamentos de von Frey. B, D y F) Área bajo la curva (ABC) del efecto de indometacina, gabapentina y morfina sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. Las barras muestran la media  $\pm$  el error estándar del número de la respuesta de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey. A, C y E) \*P < 0.05 vs grupo vehículo (Veh) por ANOVA de dos vías seguida de SNK. B, D y F) \*P < 0.05 vs grupo Veh por ANOVA de una vía seguida de SNK. n=6.**

Finalmente, se evaluó el efecto de cafeína, un antagonista de los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> utilizado como agente promotor de la vigilia y coadyuvante en el tratamiento de distintos tipos dolor. La administración de las dosis de 30 mg/kg y 10 mg/kg, pero no a la de 1 mg/kg ni del vehículo (DMSO 0.1%), disminuyó de manera estadísticamente significativa la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR, siendo la cafeína el fármaco que tuvo mayor efectividad para revertir la alodinia inducida por PMOR. El efecto antialodínico máximo de la cafeína se alcanzó 1 h después de la administración de 30 mg/kg. En este caso el umbral de retiro de la pata se mantuvo en niveles similares a las ratas *naïve* hasta por 4 h (Fig. 12A y 12B).



**Figura 12. Efecto de la cafeína sobre la alodinia táctil inducida por PMOR. A)** Curso temporal del efecto de cafeína (Caf) sobre la alodinia táctil producida por 48 h de PMOR. Los datos se expresan como el 50% del umbral de retiro de la pata en respuesta a la aplicación de filamentos de von Frey. **B)** Área bajo la curva (ABC) del efecto de cafeína sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. Las barras muestran la media  $\pm$  el error estándar del número de la respuesta de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey. A) \*P < 0.05 vs grupo vehículo (Veh), por ANOVA de dos vías seguida de SNK. B) \*P < 0.05 vs grupo Veh por ANOVA de una vía seguida de SNK. n=6.

### **8.3. Participación de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR**

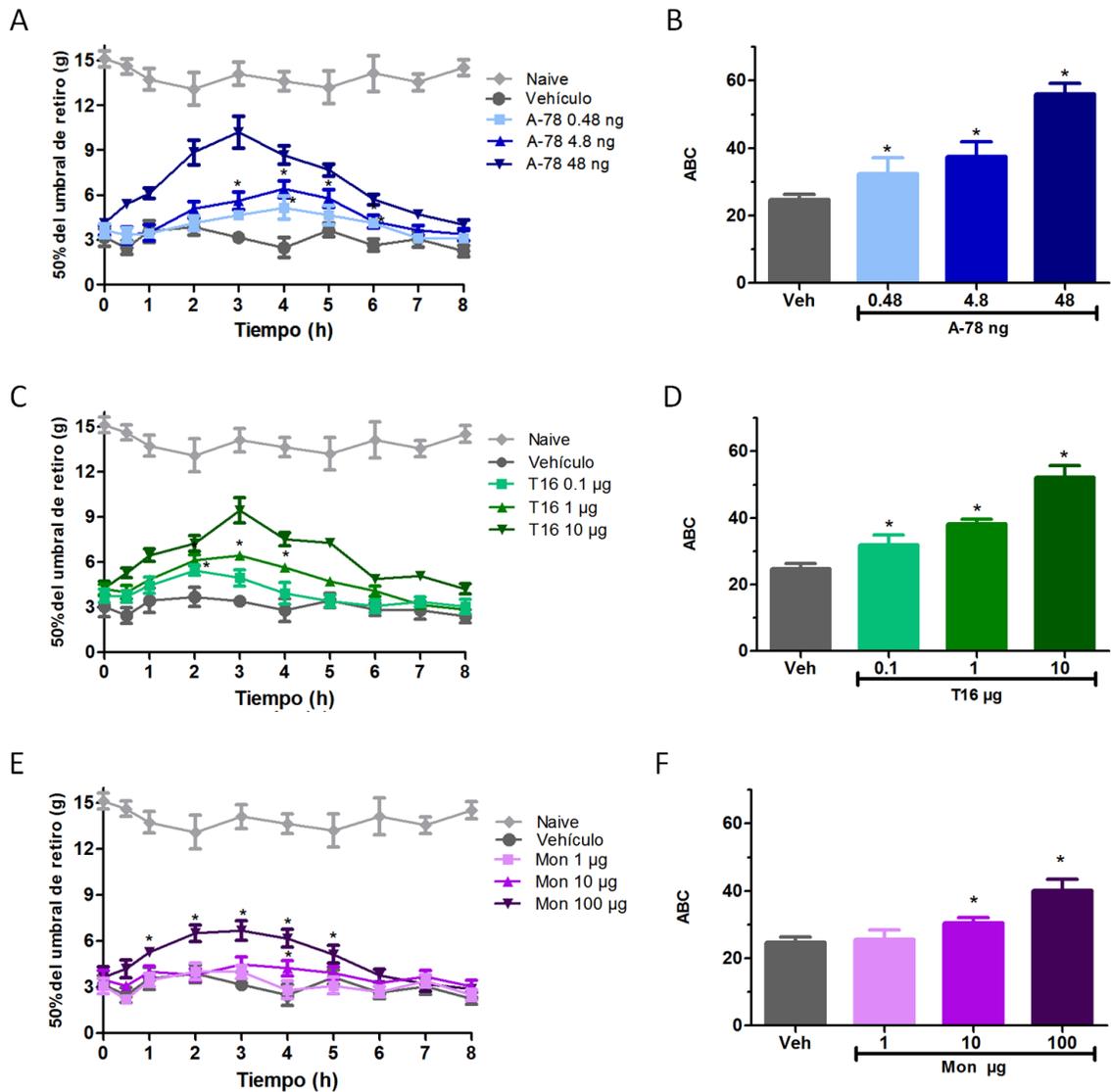
#### **8.3.1. Efecto del A-784168 en la alodinia táctil inducida por PMOR**

El bloqueo del canal TRPV1 por la administración i.t. de su antagonista selectivo A-784168 disminuyó de manera dosis dependiente y estadísticamente significativa la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. El efecto antialodínico máximo del A-784168 se observó a las 3 h posteriores a la administración de la dosis de 48 ng. Sin embargo, el A-784168 no revirtió totalmente la alodinia mecánica inducida por la PMOR (Fig. 13A y 13B).

#### **8.3.2. Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub>, y de MONNA en la alodinia táctil inducida por PMOR**

La inhibición del canal anoctamina-1 por la administración i.t. de su bloqueador selectivo, el T16A<sub>inh-A01</sub>, pero no el vehículo (DMSO 0.01%), redujo de manera dosis dependiente la alodinia táctil observada en ratas con 48 h de PMOR. El efecto antialodínico máximo del T16A<sub>inh-A01</sub> se observó a las 3 h posteriores a la administración de la dosis de 10 µg; sin embargo, el T16A<sub>inh-A01</sub> no revirtió totalmente la alodinia mecánica inducida por la PMOR (Fig. 13C y 13D).

Por otra parte, para corroborar el efecto de la inhibición del canal anoctamina-1 en la alodinia táctil observada en ratas con PMOR se utilizó MONNA, un bloqueador altamente selectivo de estos canales. La administración (i.t.) de MONNA redujo de manera dosis dependiente y estadísticamente significativa la alodinia táctil observada en ratas con 48 h PMOR. El MONNA tuvo un efecto menor al obtenido con T16A<sub>inh-A01</sub>. En este caso el efecto antialodínico máximo del MONNA se observó a las 3 h posteriores a la administración de 100 µg (Fig. 13E y 13F).

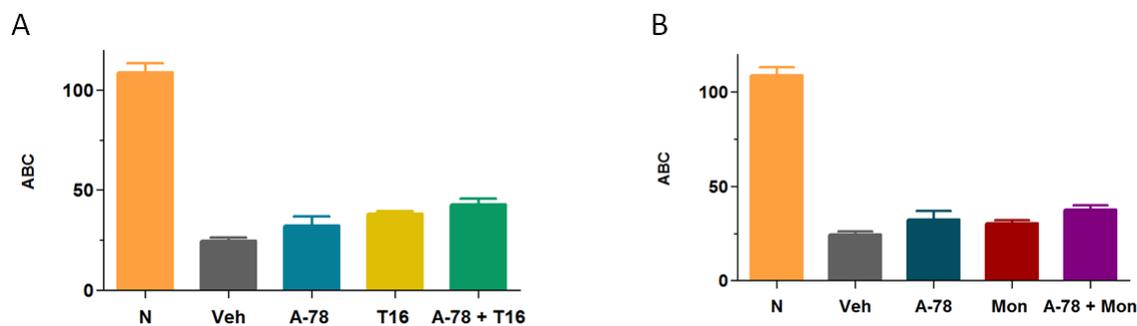


**Figura 13. Participación de los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR. A, C y E)** Curso temporal del efecto de A-784168, T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la alodinia táctil producida por 48 h de PMOR. Los datos se expresan como el 50% del umbral de retiro de la pata ante la aplicación de filamentos de von Frey. **B, D y F)** Área bajo la curva (ABC) del efecto de A-784168, T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la alodinia inducida por 48 h de PMOR. Las barras muestran la media  $\pm$  el error estándar del número de la respuesta de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey. A, C y E) \*P < 0.05 vs grupo vehículo (Veh), por ANOVA de dos vías seguida de SNK. B, D y F) \*P < 0.05 vs grupo Veh por ANOVA de una vía seguida de SNK. n=6.

### 8.3.3. Efecto de la combinación de A-784168 con T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la alodinia táctil inducida por PMOR

Con la finalidad de evaluar si existe una interacción entre los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR se llevó a cabo la administración de la combinación de dosis sub-efectivas del antagonista del canal TRPV1, el A-784168 en combinación con los bloqueadores del canal anoctamina-1, el T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA.

La co-administración i.t., de 0.48 ng de A-784168 y 0.1 µg de T16A<sub>inh-A01</sub> no tuvo efecto sobre la alodinia táctil observada en ratas con 48 h de PMOR (Fig. 14A). De manera similar, la co-administración i.t. del 0.48 ng de A-784168 y 10 µg de MONNA, tampoco tuvo efecto sobre la alodinia táctil observada en ratas con 48 h de PMOR (Fig. 14B).



**Figura 14. Efecto de la co-administración del antagonista del canal TRPV1 y los bloqueadores del canal anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por PMOR. A)** Área bajo la curva (ABC) del efecto de la co-administración de 0.48 ng de A-784168 (A-78) con 0.1 µg T16A<sub>inh-A01</sub> (T16) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. **B)** ABC del efecto de la combinación de 0.48 ng de A78 con 10 µg de MONNA (Mon) sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. Las barras muestran la media ± el error estándar del número de la respuesta de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey. n=6. Ratas *naïve* (N), vehículo (Veh).

#### **8.4 Efecto de la PMOR sobre la expresión de TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD de ratas**

La PMOR durante 24 y 48 h aumentó de manera significativa la expresión del canal TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal de ratas sometidas a privación de sueño comparadas con ratas *naïve* (Fig. 15A). Así mismo, se observó que en ratas con 24 y 48 h de recuperación de sueño MOR la expresión del canal TRPV1 disminuyó a valores significativamente menores que los observados antes de someter a las ratas a la PMOR (Fig. 15A).

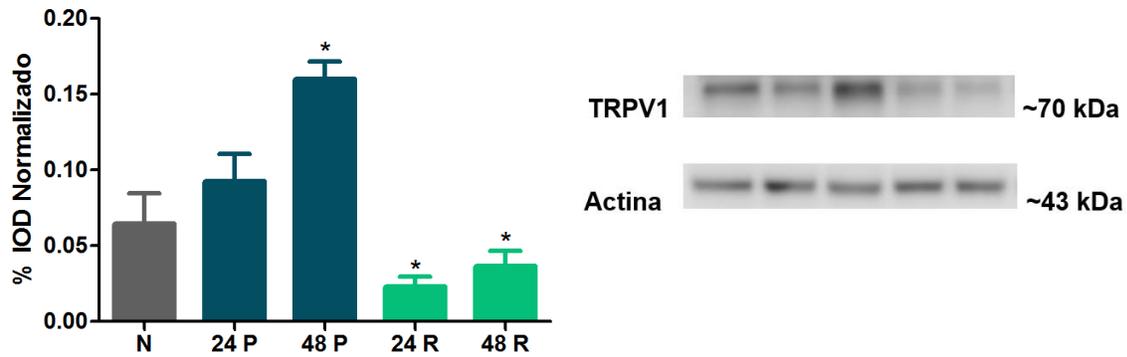
Además, la PMOR durante 48 h aumentó de manera significativa la expresión del canal TRPV1 en los GRD de ratas sometidas a privación de sueño comparada con ratas *naïve* (Fig. 15B). El nivel de expresión del canal TRPV1 regresó a los valores basales en ratas con 24 y 48 h de recuperación de sueño MOR (Fig. 15B).

#### **8.5. Efecto de la PMOR sobre la expresión de anoctamina-1 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD de ratas**

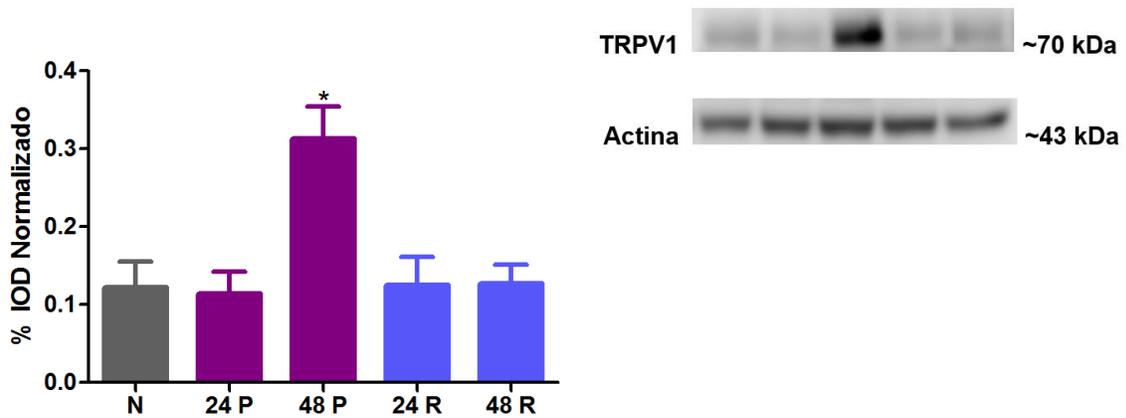
En contraste con el efecto de la PMOR sobre la expresión del canal TRPV1, la PMOR durante 24 y 48 h disminuyó la expresión del canal anoctamina-1 de manera significativa en el asta dorsal de la médula espinal de ratas sometidas a privación de sueño comparadas con ratas *naïve* (Fig. 16A). La recuperación de sueño MOR por 24 y 48 h no revirtió la disminución en la expresión de anoctamina-1 en este tejido (Fig. 16A).

Así mismo, la PMOR durante 24 y 48 h disminuyó la expresión del canal anoctamina-1 de manera significativa en los GRD de ratas con privación de sueño comparado con ratas *naïve* (Fig. 16B). Además, se observó que en ratas con 24 h de recuperación de sueño MOR la expresión del canal anoctamina-1 disminuyó a valores aún menores que durante la PMOR. Mientras que, ratas con 48 h de recuperación de sueño MOR la expresión de anoctamina-1 regresó a valores similares a la PMOR (Fig. 16B).

A

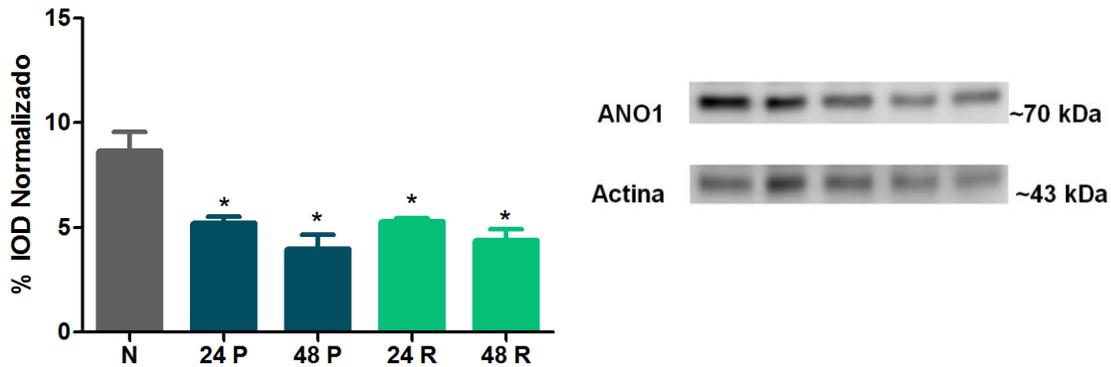


B

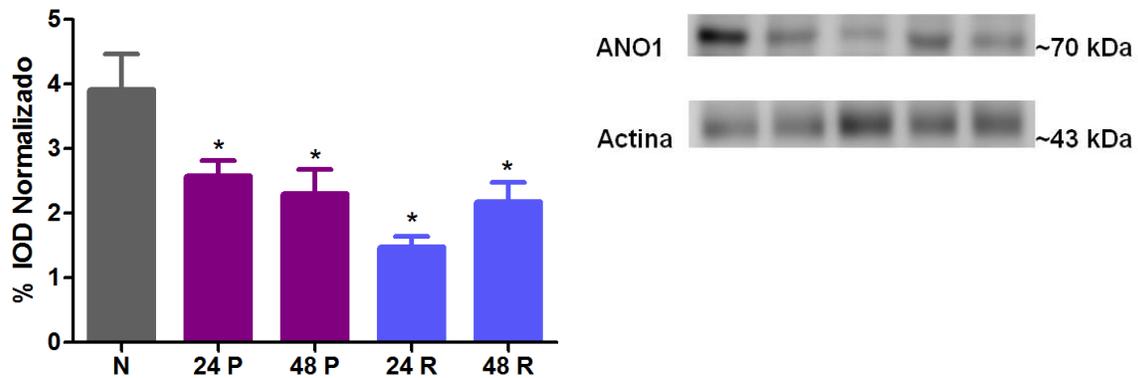


**Figura 15. Efecto de la PMOR sobre la expresión del canal TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD.** Expresión del canal TRPV1 en **A)** asta dorsal de la médula espinal y **B)** GRD (L4-L6) de ratas *naïve* (N), ratas con 24 h (24 P) o con 48 h (48 P) de PMOR y con 24 h (24 R) y 48 h (48 R) de recuperación de la PMOR por 48 h. En el lado izquierdo se muestra la cuantificación de la señal obtenida mediante el porcentaje de índice de densidad óptica (% IOD). En el panel derecho se muestran *blots* representativos de los resultados mostrados en las gráficas de barras. \*P < 0.05 vs N por ANOVA de una vía seguida de SNK. n=4.

A



B

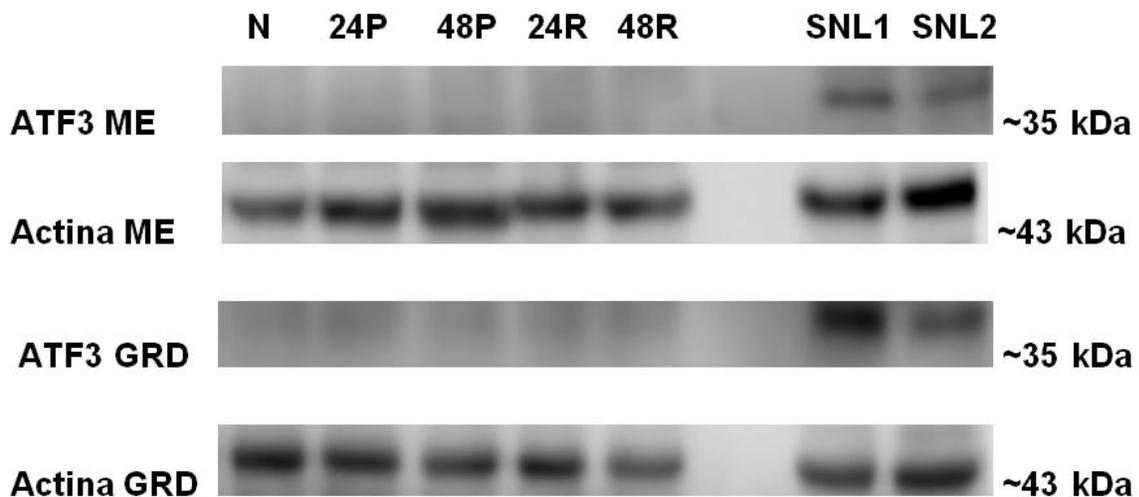


**Figura 16. Efecto de la PMOR sobre la expresión del canal anoctamina-1 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD.** Expresión del canal anoctamina-1 en **A)** asta dorsal de la médula espinal y **B)** GRD (L4-L6) de ratas *naïve* (N), ratas con 24 h (24 P) o con 48 h (48 P) de PMOR y con 24 h (24 R) y 48 h (48 R) de recuperación de la PMOR por 48 h. En el lado izquierdo se muestra la cuantificación de la señal obtenida mediante el porcentaje de índice de densidad óptica (% IOD). En el panel derecho se muestran *blots* representativos de los resultados mostrados en las gráficas de barras. \*P < 0.05 vs N por ANOVA de una vía seguida de SNK. n=4.

## 8.6. Efecto de la PMOR sobre la expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD de ratas

Para constatar que la alodinia táctil observada en ratas sometidas a PMOR no fuera producto de un daño neuronal inducido por la PMOR, se determinó el efecto de la PMOR sobre la expresión del factor de transcripción dependiente de AMPc 3 (ATF3), un marcador de daño neuronal, en el asta dorsal de la médula espinal y los GRD de ratas sometidas a PMOR. La PMOR por 24 y 48 h no indujo la expresión de ATF3 en ninguno de los dos tejidos (Fig. 17). De igual manera, la recuperación del sueño MOR tampoco provocó cambios en la expresión de ATF3 (Fig. 17).

Para determinar que la ausencia de señal de ATF3 no fuera un artefacto, se colocaron en el mismo gel muestras obtenidas de ratas sometidas a dolor neuropático mediante la ligadura de los nervios espinales L5/L6 (LNE). La LNE incrementa la expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal y en los GRD de los nervios espinales lesionados (carriles LNE en la Fig. 17).



**Figura 17. Efecto de la PMOR sobre la expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD.** Expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal (ME) y en los GRD (L4-L6) de ratas *naïve* (N), sometidas a 24 y 48 h de PMOR (24 P y 48 P, respectivamente) y de 24 o 48 h de recuperación de sueño MOR (24 R y 48 R, respectivamente). Expresión de ATF3 en ME y GRD (L5-L6) de ratas con ligadura de los nervios espinales (LNE). LNE1 y LNE2 corresponden a muestras de dos animales diferentes.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Pronocicepción inducida por privación de sueño MOR

La PMOR por 48 h generó una respuesta pronociceptiva de alodinia mecánica en ambas patas de ratas hembra y macho. Diversos estudios han demostrado que la privación de sueño induce respuestas pronociceptivas. Así, la PMOR por períodos de 48 a 72 h, mediante el modelo de plataformas múltiples, reduce los umbrales de nocicepción mecánica, térmica, química y eléctrica (Hicks et al., 1978; Onen et al., 2001b; Machado et al., 2004; Nascimento et al., 2007). Este modelo se desarrolló inicialmente en gatos y posteriormente se adaptó a ratas (Jouvet et al., 1964; Cohen et al., 1965). La PMOR tiene un componente de estrés, ya que se ha observado que aumenta los niveles de ACTH (corticotropina) y corticosterona en el modelo de plataformas múltiples; sin embargo, este efecto se puede atenuar si se realizan los experimentos con grupos de animales que cohabitan en la misma caja (Suchecki y Tufik, 2000).

Los mecanismos neurobiológicos mediante los cuales la PMOR disminuye los umbrales de nocicepción no han sido del todo elucidados. Uno de los mecanismos que tiene más evidencia es la alteración del sistema opioide. Se ha descrito que la PMOR reduce la unión de péptidos opioides a sus receptores  $\mu$  y  $\delta$  afectando su funcionalidad (Fadda et al., 1991). Aunado a esto, la PMOR elimina los efectos antinociceptivos de la inhibición de la encefalinasa, enzima encargada de la degradación de las encefalinas (Ukponmwan et al., 1984). Además, se ha descrito que la PMOR inhibe la síntesis de opioides (Shapiro y Girdwood, 1981).

La privación de sueño MOR altera al sistema colinérgico. De hecho, tanto la nocicepción como el sueño MOR están modulados por el sistema colinérgico. La administración intratecal de colinomiméticos tiene efectos antinociceptivos (Iwamoto, 1999). La acetilcolina juega un papel importante en el control del sueño MOR. La administración de agonistas colinérgicos como el

carbacol, el betanecol y la neostigmina en la formación reticular, produce y mejora el sueño MOR (Kshatri et al., 1998). En contraste, la PMOR disminuye la actividad colinérgica en la corteza cerebral de la rata (Thakkar y Mallick, 1991; Tufik et al., 1987). También se ha demostrado que los colinomiméticos disminuyen la transmisión nociceptiva en las regiones reticulares pontinas, involucradas en la generación de sueño MOR en el gato (Kshatri et al., 1998).

Aunado a estos dos sistemas de neurotransmisión, el sistema serotoninérgico participa en los mecanismos de control del dolor y del sueño MOR. El núcleo dorsal del rafé es la estructura cerebral con la mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas. Esta estructura presenta una mayor tasa de disparo durante la vigilia, una menor tasa de disparo durante el sueño no MOR y una actividad mínima durante el sueño MOR (McGinty y Harper, 1976). Se ha reportado que la inyección i.t. de serotonina induce efectos antinociceptivos en la rata (Hamon y Bourgoin, 1999). La PMOR aumenta el metabolismo de la serotonina en el cerebro de la rata; la reducción en los niveles de serotonina puede inducir parcialmente un estado pronociceptivo en animales privados de sueño MOR (Youngblood et al., 1997).

En el presente trabajo la alodinia mecánica inducida por la PMOR por 48 h no fue diferente entre ratas macho y hembra. Este resultado contrasta con lo publicado por Araujo et al (2011) que reportan que tanto ratones macho como hembra C57BL/6 sometidos a 72 h de PMOR presentan umbrales de nocicepción térmica significativamente menores comparados con los animales control; sin embargo, el umbral de nocicepción fue menor en los ratones hembra comparado con el de los machos. Además, en ambos sexos, 24 h de recuperación de sueño fueron suficientes para que los umbrales de nocicepción térmica regresaran a la normalidad (Araujo et al., 2011). Por otro lado, nuestros datos coinciden con lo reportado por Larson y Carter (2016) que encontraron que la privación de sueño en humanos reduce los umbrales de nocicepción térmica de manera similar en ambos géneros. Las diferencias entre nuestro trabajo y el publicado por Araujo y colaboradores pueden explicarse debido a

que la hipersensibilidad térmica y la hiperalgesia mecánica activan cascadas moleculares distintas en la médula espinal. La hipersensibilidad térmica se basa principalmente en la activación de receptores NMDA espinales, la traslocación de la PKC, así como la reducción del óxido nítrico y el GMPc. Mientras que, la hipersensibilidad mecánica se basa principalmente en la coactivación de los receptores AMPA y metabotrópicos para glutamato (mGlu), espinales, la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y la síntesis de metabolitos de la vía de la ciclooxigenasa (Meller, 1994).

## **9.2. Efectividad de fármacos analgésicos sobre la magnitud de la alodinia táctil inducida por PMOR**

La indometacina es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), cuyo mecanismo de acción es la inhibición no selectiva de las ciclooxigenasas 1 y 2, enzimas que catalizan la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (Lucas, 2016). Los AINEs son utilizados para atenuar la hipersensibilidad en modelos animales de dolor inflamatorio (Lynch et al., 2004; Joshi et al., 2006; Ortega-Álvaro et al., 2012). La privación de sueño eleva los niveles de prostaglandinas (PG), particularmente PGE<sub>2</sub>, en modelos animales (Ram et al., 1997). Además, en humanos la reducción del tiempo de sueño aumenta los niveles de prostaglandinas y aumenta el dolor espontáneo (Haack et al., 2009).

En este trabajo se evaluó el efecto de la indometacina sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR obteniendo un efecto antinociceptivo modesto con la dosis máxima utilizada (10 mg/kg). El efecto de los AINEs ha sido previamente estudiado en modelos de privación de sueño. De manera similar a los datos obtenidos en este trabajo, la administración s.c. de ibuprofeno (30 mg/kg y 100 mg/kg) reduce modestamente la hipersensibilidad inducida por privación de sueño en un modelo de restricción de sueño de 8 h diarias por una semana en ratas (Wodarski et al., 2015). Además, la administración

intraperitoneal de flurbiprofeno (15 mg/kg y 40 mg/kg) reduce de manera estadísticamente significativa la hiperalgesia térmica inducida por 96 h de PMOR evaluada mediante la prueba de retiro de cola en ratas (Gürel et al., 2014).

Asimismo, se evaluó el efecto de gabapentina, un fármaco anticonvulsivante análogo del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que se utiliza para el tratamiento del dolor neuropático. La gabapentina ejerce su acción antinociceptiva a través de su unión a la subunidad  $\alpha_2\delta$ -1. La subunidad  $\alpha_2\delta$ -1 se asocia con los canales  $Ca_v$  y los receptores NMDA favoreciendo su transporte e inserción en la membrana plasmática. Por lo tanto, la unión de gabapentina a la subunidad  $\alpha_2\delta$ -1 reduce la excitabilidad al inhibir a los canales  $Ca_v$  y NMDA a nivel pre y postsináptico en la médula espinal (Kukkar et al., 2013; Chen et al., 2018). En nuestro estudio se determinó que la administración de gabapentina disminuyó la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR pero no la eliminó por completo. En concordancia con nuestros datos, se ha reportado que las dosis de 30 mg/kg y 50 mg/kg de gabapentina no reducen la hipersensibilidad térmica y mecánica inducida por la restricción de sueño por 8 h diarias por una semana en ratas (Wodarski et al., 2015). La poca eficacia de gabapentina en reducir la alodinia inducida por la PMOR sugiere que los mecanismos neurobiológicos que generan la alodinia por la privación de sueño son diferentes a los involucrados en el dolor neuropático.

La morfina es un fármaco opioide cuyo principal mecanismo de acción es su unión a los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en el SNC. Dependiendo el tipo de tejido y ensayo, la morfina se comporta como un agonista completo, mientras que en otros puede comportarse como un agonista parcial o incluso como antagonista (Kelly, 2013). La morfina tiene diversos efectos en el organismo dependiendo del tipo de receptor al cual se une. La activación del receptor  $\mu$  se asocia con la producción de analgesia, sedación, euforia, dependencia física y depresión respiratoria. La activación de los receptores  $\kappa$  y

$\delta$  se asocia con la producción de analgesia espinal (Al-Hasani y Bruchas, 2011).

En este trabajo se evaluó el efecto de la administración de morfina sobre la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. Los resultados obtenidos indican que la morfina fue el fármaco que menos efecto antialodínico tuvo sobre la alodinia táctil inducida por la PMOR. Otros grupos de investigación han obtenido resultados similares a los nuestros. Por ejemplo, la privación de sueño MOR por 96 h abole completamente la acción antinociceptiva de la morfina (20  $\mu$ g i.c.v.) (Ukponmwan et al., 1984). El efecto limitado de la morfina para reducir la alodinia táctil inducida por la PMOR posiblemente sea resultado de la disminución en la actividad de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  que ha sido descrita previamente (Fadda et al., 1991).

Por último, se evaluó el efecto de la cafeína, un antagonista de los receptores de adenosina  $A_1$  y  $A_{2A}$  utilizado como agente promotor de la vigilia. En el presente trabajo se observó que la administración de cafeína eliminó la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR. El efecto antialodínico de la cafeína se mantuvo aún por 8 h después de su administración. De manera similar a nuestros resultados, se ha reportado que la administración de cafeína y de otros promotores del estado de alerta, como modafinil, revierten la alodinia inducida por privación de sueño en roedores (Alexandre et al., 2017).

La adenosina es un nucleósido cuyos receptores están involucrados en el proceso de la nocicepción. Los receptores  $A_1$  tienen acciones antinociceptivas a nivel periférico, espinal y supraespinal, mientras que, los receptores  $A_2$  tienen un papel pronociceptivo mediante el aumento en los niveles de AMP cíclico (AMPc) en las aferentes primarias (Sawynok, 1998). La estructura de la cafeína es similar a la adenosina y, por lo tanto, compite con ésta por los receptores a adenosina. El efecto antinociceptivo de la cafeína se ha asociado a su acción como antagonista de los receptores  $A_2$  y la subsecuente disminución en los niveles de AMPc (Sawynok, 1998). Aunado a esto, la cafeína es capaz de inhibir la actividad de la ciclooxigenasa, enzima

encargada de la producción de prostaglandinas, lípidos involucrados en la sensibilización dolorosa (Baratloo et al., 2016).

El efecto antialodínico observado con los diferentes fármacos analgésicos utilizados (indometacina, gabapentina y morfina), sugiere que la alodinia inducida por la PMOR es consecuencia de mecanismos neurobiológicos diferentes a aquellos que subyacen al dolor de tipo inflamatorio y neuropático. El propósito de este estudio fue caracterizar el modelo de privación de sueño MOR en el laboratorio y determinar si en nuestras condiciones experimentales presenta las características descritas por trabajos previos. Por último, los resultados obtenidos tras la administración de cafeína sugieren una clara relación entre el estado de alerta y el proceso de sensibilización y percepción de estímulos dolorosos.

### **9.3. Participación de los canales TRPV1 en la alodinia mecánica inducida por PMOR**

En este trabajo se evaluó la posible participación del receptor TRPV1 en el procesamiento de las conductas nociceptivas inducidas por la privación de sueño MOR. Para este propósito, se utilizó un antagonista altamente selectivo del canal TRPV1: el A-764168. Este antagonista inhibe el flujo de  $Ca^{2+}$  inducido por capsaicina *in vitro* y además inhibe moderadamente al canal TRPM8, con una concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de 20.8  $\mu M$ , comparada con la que presenta en canales TRPV1 ( $CI_{50}$ = 10  $\mu M$ ). El A-764168 no tiene efecto en otros receptores que participan en el proceso de nocicepción como los receptores a cannabinoides (CB1 y CB2), a serotonina (5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>5</sub>), colescitoquinina (CCK1 y CCK2), endotelina (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>), histamina (H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>), opioides ( $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ), purinérgicos (P2X y P2Y), adenosina (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>3</sub>), receptores GABA<sub>A</sub>, y el receptor de potencial transitorio subtipo A (TRPA1) (Cui et al., 2006).

La eficacia antinociceptiva del A-784168 ha sido estudiada previamente en diversos modelos de dolor. El A-784168 disminuye la hiperalgesia y la alodinia inducidas por formalina (Martínez-Rojas et al., 2014), reduce la hipersensibilidad mecánica y térmica inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Mills et al., 2013) y bloquea la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica inducida por CFA (Cui et al., 2006). En este estudio se demostró que la administración del A-764168 reduce la alodinia táctil inducida por PMOR, esto sugiere la participación del canal TRPV1 en la generación de la alodinia táctil inducida por PMOR.

#### **9.4. Participación del canal anoctamina-1 en la alodinia mecánica inducida por PMOR**

Para evaluar la participación del canal anoctamina-1 en el desarrollo de alodinia táctil inducida por PMOR se utilizaron dos bloqueadores selectivos del canal anoctamina-1, el T16A<sub>inh-A01</sub> y el MONNA.

T16A<sub>inh-A01</sub> es un aminofeniltiazol que bloquea potentemente las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por la activación del canal anoctamina-1 con una IC<sub>50</sub> de 1 μM en células bronquiales e intestinales (Namkung et al., 2011). En los GRD, el T16<sub>inh-A01</sub> disminuye las corrientes de Cl<sup>-</sup> del canal anoctamina-1 evocadas por la activación de canales TRPV1 con capsaicina (15 μM) a concentraciones fisiológicas de [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> (~40 mM en neuronas nociceptivas) (Deba y Bessa, 2015).

En este trabajo se determinó que el T16A<sub>inh-A01</sub> redujo la alodinia táctil observada en ratas con 48 h de PMOR. A nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se estudia la participación del canal anoctamina-1 en la transmisión nociceptiva inducida por privación de sueño, aunque ha sido descrita su participación en el dolor inflamatorio y neuropático. En este sentido, se ha descrito que el T16A<sub>inh-A01</sub> atenúa las respuestas pronociceptivas de lamida, sacudida y retirada inducidas por la inyección subcutánea de 5 mM de

Eact (3,4,5-trimetoxi-N-(2-metoxietil)-N-(4-fenil-2-tiazolil)benzamida), un activador de anoctamina-1, o de 50  $\mu$ M de capsaicina (Deba y Bessa, 2015). De igual manera, el T16A<sub>inh-A01</sub> inhibe las conductas pronociceptivas inducidas por la inyección intraplantar de 300  $\mu$ M de capsaicina (Takayama et al., 2015). Además, el T16A<sub>inh-A01</sub> reduce la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica en el modelo de dolor neuropático inducido por la LNE (Pineda-Farías et al., 2015; García et al., 2018).

MONNA es un inhibidor selectivo del canal anoctamina-1 (IC<sub>50</sub> ~1  $\mu$ M) y no interactúa con otros canales de Cl<sup>-</sup> como el CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), CIC-2 (canales de Cl<sup>-</sup> activado por ligando 2) y el canal bestrofina-1 (Ta et al., 2016). Se ha descrito que MONNA reduce parcialmente la alodinia mecánica inducida por la LNE (García et al., 2018).

En el presente trabajo se observó que MONNA redujo la alodinia táctil inducida por 48 h de PMOR en ratas. De manera similar a los datos obtenidos en este estudio, se ha descrito que MONNA tuvo un efecto antialodínico menor que el T16A<sub>inh-A01</sub> en el dolor neuropático inducido por la LNE en ratas (García et al., 2018). Aunque se ha descrito que el T16A<sub>inh-A01</sub> es un bloqueador específico para el canal anoctamina-1, también se ha reportado que puede actuar sobre otros canales como por ejemplo canales de Ca<sub>v</sub> (Boedtkjer et al., 2015), por lo tanto, es posible que parte de los efectos antialodínicos que observamos con el T16A<sub>inh-A01</sub> se deba a la acción con otros blancos moleculares. Sin embargo, los resultados de MONNA indican que el canal anoctamina-1 tiene una modesta contribución en la alodinia táctil inducida por la PMOR.

Se ha descrito que en neuronas del GRD de ratón existe una interacción entre los canales TRPV1 y anoctamina-1 que aumenta la excitabilidad en las aferentes primarias (Takayama et al., 2015). Por lo tanto, fue de nuestro interés determinar si en la alodinia táctil inducida por la PMOR podría existir una interacción entre ambos canales. Los datos obtenidos de la co-administración

de A-784168 con T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA indican que no existe una interacción entre los canales TRPV1 y anoctamina-1 en la sensibilización dolorosa inducida por la PMOR.

### **9.5. Regulación de la expresión de los canales TRPV1 y anoctamina-1 inducida por PMOR**

En el presente trabajo se observó que la PMOR por 48 h aumentó la expresión del canal TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal y en los GRD (L4-L6). Consistente con nuestro trabajo, se ha reportado que en estados proinflamatorios aumenta la expresión del canal TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD (Breese et al., 2005; Luo et al., 2004). Por ejemplo, la expresión del canal TRPV1 aumentó 24 h después de la administración de coadyuvante completo de Freund (CFA) en neuronas del GRD (Ji et al., 2002). En contraste, en la mayoría de modelos de dolor neuropático la expresión del canal TRPV1 disminuye en el asta dorsal de la médula espinal y GRD. Por ejemplo, en la axotomía del nervio ciático (Michael y Priestley, 1999), la ligadura parcial del nervio (Hudson et al., 2001), la constricción crónica del nervio ciático (Schafers et al., 2003) y la LNE (Schafers et al., 2003b). La disminución de la expresión del canal TRPV1 se debe a la pérdida de neuronas inmuno-positivas a TRPV1 (Choi et al., 2016).

Como dato interesante se observó que la recuperación de la PMOR por 48 h redujo la expresión del canal TRPV1 en la médula espinal, incluso a niveles menores que los observados en las ratas *naïve*. No se tiene una explicación para esta observación ya que en nuestro entendimiento no hay reportes en modelos de dolor que se haya descrito algo similar. De hecho, los mecanismos moleculares que regulan la expresión del canal TRPV1 en las neuronas de segundo orden en la médula espinal permanecen indeterminados.

Por otra parte, se ha descrito que la expresión del canal anoctamina-1 aumenta en el asta dorsal de la médula espinal y en GRD de ratas con dolor

inflamatorio crónico y con dolor neuropático inducido por la LNE (García et al., 2014; Pineda-Farías et al., 2015; García y et al., 2018). De manera contraria a lo reportado, los datos obtenidos en este trabajo muestran que la PMOR por 48 h disminuye la expresión del canal anoctamina-1 en el asta dorsal de la médula espinal y los GRD (L4-L6), y su expresión no regresa a niveles basales después de 24 y 48 h de recuperación de la PMOR. El efecto antialodínico modesto observado con los bloqueadores del canal anoctamina-1 en ratas con PMOR podría deberse a la reducción en la expresión de este canal por la PMOR.

### **9.6. Expresión de ATF3 en la PMOR**

El factor de transcripción ATF3 es miembro de la familia de factores de transcripción ATF/CREB, cuya expresión se induce por daño neuronal. ATF3 regula la transcripción mediante su unión a sitios consenso dentro del ADN en forma de homodímeros o formando heterodímeros con otros factores de transcripción como Jun (Tsujino et al., 2000). La expresión de ATF3 ha sido ampliamente utilizada como marcador de daño neuronal. Se ha descrito que el daño neuronal producido por la axotomía o la ligadura de los nervios espinales aumenta la expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal y los GRD (Tsujino et al., 2000; Tsuzuki et al., 2001; Shortland et al., 2006; Bráz y Basbaum, 2010; García et al., 2018).

En el presente trabajo se observó que la PMOR por 48 h no induce la expresión de ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal y GRD, lo que nos permite sugerir que la PMOR no induce un daño identificable en tejidos relevantes para nocicepción como son los GRD y el asta dorsal de la médula espinal, reforzando la teoría de que las conductas pronociceptivas inducidas por privación de sueño MOR pertenecen al dolor de tipo disfuncional, debido a que no hay un daño identificable en el sistema nervioso central.

## 10. CONCLUSIONES

- El efecto antialodínico observado con los diferentes fármacos analgésicos utilizados (indometacina, gabapentina y morfina), sugiere que la alodinia inducida por la PMOR es consecuencia de mecanismos neurobiológicos diferentes a aquellos que subyacen al dolor de tipo inflamatorio y neuropático.
- La eficacia de la cafeína para revertir los efectos pronociceptivos inducidos por la PMOR nos permite sugerir que existe una relación entre el estado de alerta y el proceso de sensibilización y percepción de estímulos dolorosos.
- Los resultados farmacológicos y moleculares obtenidos permiten sugerir que el canal TRPV1, más no el canal anoctamina-1, participa en la alodinia táctil inducida por la PMOR en ratas.
- La PMOR no induce la expresión del marcador de daño neuronal ATF3 lo que nos permite sugerir que la PMOR no provoca un daño al sistema nervioso central y que el dolor generado por esta condición es de tipo disfuncional.

## 11.PERSPECTIVAS

- Determinar la participación de otros blancos moleculares del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> que participan en el proceso de nocicepción, como el canal bestrofina-1, en la generación de alodinia inducida por la PMOR.
- Determinar farmacológica y molecularmente, los mecanismos implicados en la regulación de la expresión del canal TRPV1 inducida por la PMOR.
- Determinar si la privación de sueño MOR produce cambios en la expresión de los receptores a adenosina A<sub>2</sub>.

## 12. REFERENCIAS

- Alexandre C, Latremoliere A, Ferreira A, Miracca G, Mihoko Y, Scammell T, Woolf C. 2017. Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice. *Nature Medicine* 23: 768-774.
- Al-Hasani R, Bruchas M. 2011. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* 115: 1363-1381.
- Al-Jumaily M, Kozlenkov A, Mechaly I, Fichard A, Matha V, Scamps F, Valmier J, Carroll P. 2007. Expression of three distinct families of calcium-activated chloride channel genes in the mouse dorsal root ganglion. *Neuroscience Bulletin*. 23:293-9.
- André S, Boukhaddaoui H, Campo B, Al-Jumaily M, Mayeux V, Greuet D, Valmier J, Scamps F. 2003. Axotomy-induced expression of calcium activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neurophysiology* 90: 3764-3773.
- Araujo P, Mazaro-Costa R, Tufik S, Andersen M. 2011. Impact of sex on hyperalgesia induced by sleep loss. *Hormones and Behavior* 59: 174-179.
- Aserinsky E, Kleitman N. 1953. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-274.
- Aurilio C, Pota V, Pace M, Passavanti M, Barbarisi M. 2008. Ionic channels and neuropathic pain: Physiopatology and applications. *Journal of Cellular Physiology* 215: 8-14.
- Bandler R, Keay KA. 1996. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Progress in Brain Research* 107: 285-300.
- Baratloo A, Rouhipour A, Forouzanfar M, Safari S, Amini M, Negida A. 2016. The role of caffeine in pain management a brief literature review. *Anesthesiology and pain medicine* 6.

- Basbaum A, Fields H. 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Reviews of Neuroscience* 7: 309-338.
- Basbaum A, Bautista D, Scherrer G, Julius D. 2009. Cellular and molecular mechanism of pain. *Cell* 139: 267-284.
- Benarroch E. 2015. Ion channels in nociceptors. Recent developments. *Neurology* 84: 1153-1164.
- Benington J, Kodali S, Heller H. 1995. Stimulation of A1 adenosine receptors mimics the electroencephalographic effects of sleep deprivation. *Brain Research* 692: 79-85.
- Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353: 1610-1615.
- Bingel U, Schoell E, Herken W, Buchel C, May A. 2007. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system. *PAIN* 131: 21-30.
- Bjorvatn B, Gronli J, Hamre F, Sorensen E, Fiske E, Bjorkum A. 2002. Effects of sleep deprivation on extracellular serotonin in hippocampus and frontal cortex of the rat. *Neuroscience* 113: 323-330.
- Blair N, Bean B. 2003. Role of tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current slow inactivation in adaptation of action potential firing in small-diameter dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* 23: 10338-10350.
- Boedtker D, Kim S, Jensen A, Matchkov V, Andersson K. 2015. New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels –T16A<sub>inh-A01</sub>, CaCC<sub>inh-A01</sub> and MONNA – what do they inhibit? *British Journal of Pharmacology* 172: 4158-4172.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy J. 1996. Laminar compartmentalization of GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *Journal of Neuroscience* 16: 283-297.

- Boudes M, Scamps F. 2012. Calcium-activated chloride current expression in axotomized sensory neurons: what for? *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5: 35.
- Bráz J, Basbaum A. 2010. Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain* 150: 290-230.
- Breese N, George A, Pauers L, Stucky C. 2005. Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* 115: 37-49.
- Caterina M, Schumacher M, Tominaga M, Rosen T, Levine J, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824.
- Chen J, Li L, Chen SR, Chen H, Xie JD, Sirrieh RE, MacLean DM, Zhang Y, Zhou MH, Jayaraman V, Pan HL. The  $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor complex is critically involved in neuropathic pain development and gabapentin therapeutic actions. *Cell Rep.* 2018 22(9): 2307-2321.
- Chen Y, Willcockson H, Valtschanoff J. 2009. Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Experimental Neurology* 220: 383-390.
- Cho H, Yang Y, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back S, Na H, Harfe B, Wang F, Raouf R, Wood J, Oh U. 2012. The calcium activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nature Neuroscience* 15: 1015-1021.
- Choi S, Lim J, Yoo S, Kim H, Hwang S. 2016. Emerging role of spinal cord TRPV1 in pain exacerbation. *Neural plasticity*.
- Cirelli C. 2018. Insufficient sleep: Definition, epidemiology, and adverse outcomes. Up to date.

- Clapham D, Runnels L, Strubing C. 2001. The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 387-396.
- Cohen H, Dement W. 1965. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 50:1318-9.
- Coenen A, Van Luijckelaar E. 1985. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiology Behavior* 35: 501-504.
- Cortes-Romero C, Galindo F, Galicia-Isasmendi S, Flores A. 2011. GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revista Neurología* 52: 665-675.
- Costigan M, Woolf M. 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity an the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 7723-7730.
- Costigan M, Scholz J. 2009. Neurophatic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Reviews of Neurosciencia* 32: 1-32.
- Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, Chandran P, Gomtsyan A, Brown B, Bayburt E, Marsh K, Bianchi B, McDonald H, Niforatos W, Neelands T, Moreland R, Decker M, Lee C, Sullivan J, Faltynek C. 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *Journal of Neuroscience* 37: 9385-9393.
- Deba F, Bessac B. 2015. Anoctamin-1 Cl<sup>-</sup> channels in nociception: activation by an N-aroylaminothiazole and capsaicin and inhibition by T16A[inh]-A01. *Molecular pain* 11: 55.
- Dement W. 1965. An essay on dreams: the role of physiology in understanding their nature. *New Directions in Psychology* II: 135-257.
- Dixon W. 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 20: 441-462.

- Duran C, Hartzell H. 2011. Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacologica Sinica* 31: 685-692.
- Fadda P, Tortorella A, Fratta W. 1991. Sleep deprivation decreases mu and delta opioid receptor binding in the rat limbic system. *Neuroscience Letters*. 129: 315-317.
- Farooqui S, Brock J, Zhou J. 1996. Changes in monoamines and their metabolite concentrations in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54: 385-391.
- Finan P, Goodin B, Smith M. 2013. The association of sleep and pain: an update and a path forward. *The Journal of Pain* 14: 1539-52.
- Flor H, Diers M, Birbaumer N. 2004. Peripheral and electrocortical responses to painful and non-painful stimulation in chronic pain patients, tension headache patients and healthy controls. *Neuroscience Letters* 361: 147-150.
- Fradda P, Fratta W. 1997. Stress-induced sleep deprivation modifies corticotropin releasing factor (CRF) levels and CRF binding in rat brain and pituitary. *Pharmacology Research* 35: 443-446.
- Gallopín T, Fort P, Eggermann E. 2000. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404: 992-995.
- García G, Martínez-Rojas V, Rocha-González H, Granados-Soto V, Murbartián J. 2014. Evidence for the participation of Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels in formalin-induced acute and chronic nociception. *Brain Research* 1579: 35-44.
- García G, Martínez-Rojas V, Oviedo N, Murbartián J. 2018. Blockade of anoctamin-1 in injured and uninjured nerves reduces neuropathic pain. *Brain Research*.

- Gebhart G. 2004. Descending modulation of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27: 729-737.
- Gunthorpe M, Chizh B. 2009. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discovery Today* 14: 56-67.
- Gürel E, Ural K, Öztürk G, Öztürk L. 2014. Flurbiprofen in rapid eye movement sleep deprivation induced hyperalgesia. *Physiology and Behavior* 128: 155-158.
- Haack M, Lee E, Cohen D, Mullington J. 2009. Activation of the prostaglandin system in response to sleep loss in healthy humans: Potential mediator of increased spontaneous pain. *Pain* 145: 136-141.
- Haack M, Scott-Sutherland J, Santangelo G, Simpson NS, Sethna N, Mullington JM. 2012. Pain sensitivity and modulation in primary insomnia. *European Journal of Pain* 16: 522-33.
- Hamon M, Bourgoin S. 1999. Serotonin and its receptors in pain control. *Novel Aspects of Pain Management: Opioids and Beyond*. Wiley–Liss, New York: 203-228.
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J. 2005. Calcium-activated chloride channels. *Annual Review of Physiology* 67: 10-22.
- Haythornthwaite J, Hegel M, Kerns R. 1991. Development of a sleep diary for chronic pain patients. *Journal of Pain and Symptom Management* 6: 65-72.
- Hicks R, Moore J, Findley P, Hirshfield C, Humphrey V. 1978. Rem Sleep Deprivation and Pain Thresholds in Rats. *Perceptual and Motor Skills* 3: 848-850.
- Hoshino K, Pompeiano O. 1976. Selective discharge of pontine neurons during the postural atonia produced by an anticholinesterase in the decerebrate cat. *Archives Italiennes de Biologie* 114: 244-247.

- Huang F, Wong X, Jan L. 2012. International union of basic and clinical pharmacology LXXXV: Calcium activated chloride channels. *Pharmacological Reviews* 64: 1-15.
- Hudson L, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J. 2001. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *European Journal of Neuroscience* 13: 2105-2114.
- Hyman S, Cassem N. (1995). *Dolor. Neurología. Edición Científica médica latinoamericana*: 1-20.
- Iwamoto E. Cholinergic agonists as analgesics. 1999. *Novel Aspects of Pain Management: Opioids and Beyond*. Wiley-Liss, New York: 265-286.
- Jara-Oseguera A, Simon S, Rosenbaum T. 2008. TRPV1: on the road to pain relief. *Current Molecular Pharmacology* 1: 255-269.
- Ji R, Samad T, Jin S, Schmoll R, Woolf C. 2002. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 1: 57-68.
- Joshi S, Hernandez G, Mikusa J, Zhu C, Zhong C, Salyers A, Wismer C, Chandran P, Decker M, Honore P. 2006. Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience* 143: 587-596.
- Jouvet D, Vimont E, Delorme F, Jouvet M. 1964. Étude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *Journal de Physiologie*, 56: 381.
- Julius D, Basbaum A. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210.
- Jung J, Lee S, Hwang S, Cho H, Shin J, Kang Y, Kim S, Oh U. 2002. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 44448-44454.

- Kaneko H, Putzier I, Frings S, Gensch T. 2002. Determination of intracellular chloride concentration in dorsal root ganglion neurons by fluorescent lifetime imaging. *Current Topics in Membranes* 53: 167-189.
- Kim Y, Back S, Davies A, Jeong H, Jo H, Chung G, Na H, Bae Y, Kim S, Kim J, Jung S, Oh S. 2012. TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord. *Neuron* 74: 640-647.
- Kissin I, Szallasi A. 2011. Therapeutic targeting of TRPV1 by resiniferatoxin, from preclinical studies to clinical trials. *Current Topics of Medicinal Chemistry* 11: 2159-2170.
- Koban M, Sita L, Le W, Hoffman G. 2008. Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep* 31: 927-933.
- Kshatri A, Baghdoyan H, Lydic R. 1998. Cholinomimetics, but not morphine, increase antinociceptive behavior from pontine reticular regions regulating rapid-eye-movement sleep. *Sleep* 21: 677-685.
- Kukkar A, Bali A, Singh N, Jaggi A. 2013. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Archives of Pharmacology Research* 36: 237-251.
- Kullmann D, Ruiz A, Rusakov D, Scott R, Semyanov A, Walker M. 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA<sub>A</sub> receptors in the CNS: where and why? *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 87: 33-46.
- Kumar A, Chanana P. 2014. Sleep reduction: a link to other neurobiological diseases. *Sleep and biological rhythms* 12: 150-161.
- Laird J, García-Nicas E, Delpire E, Cervero f. 2004. Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride cotransporter in hyperalgesia. *Neuroscience Letters* 361: 200-203.

- Larson R, Carter J. 2016. Total sleep deprivation and pain perception during cold noxious stimuli in humans. *Scandinavian Journal of Pain* 13: 12-16.
- Latremoliere A, Woolf C. 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of Pain* 10: 895-926.
- Lee B, Cho H, Jung J, Yang YD, Yang DJ, Oh U. 2014. Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Molecular Pain* 10: 5.
- 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: 1376-1383.
- Liu B, Linley J, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, Gamper N. 2010. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K<sup>+</sup> channels and activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Journal of Clinical Investigation* 120: 1240-1252.
- Lucas S. 2016. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache Currents* 56: 436-446.
- Luo H, Cheng J, Man J, Wan Y. 2004. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *NeuroReport* 15: 655-658.
- Lynch J, Wade C, Zhong C, Mikusa J, Honore, P. 2004. Attenuation of mechanical allodynia by clinically utilized drugs in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. *Pain* 110: 56-63.
- Machado R, Hipólido D, Benedito-Silva A, Tufik S. 2004. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research* 1004: 45-51.
- Martínez-Rojas V, Barragán-Iglesias P, Rocha-González H, Murbartián J, Granados-Soto V. (2014). Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced

- secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacological Reports* 66, Issue 6: 964-971.
- McCarley R. 2007. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Medicine* 8: 302–330.
- McGinty D, Harper R. 1976. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Research* 101: 569-575.
- McHugh J, McHugh W. 2002. Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN Clinical Issues Advanced Practice in Acute and Critical Care* 11: 168-178.
- McMahon S, Koltzenburg M. 2005. Wall and Melzack's Textbook of Pain. Churchill Livingstone, London. Cap. 6. Spinal cord plasticity and pain.
- Meller S. 1994. Thermal and mechanical hyperalgesia. A distinct role for different excitatory amino acid receptors and transduction pathways? *The Journal of Pain* 3: 215-231.
- Mencías-Hurtado A, Rodríguez-Hernández J. 2012. Trastornos del sueño en el paciente con dolor crónico. *Revista de la Sociedad Española del Dolor* 19: 332-334.
- Merskey H. 1979. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on taxonomy. *Pain* 6: 249-252.
- Michael G y Priestley J. 1999. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *Journal of Neuroscience* 19: 1844-1854.
- Mileykovskiy B, Kiyashchenko L, Kodama T, Lai Y, Siegel, J. 2000. Activation of pontine and medullary motor inhibitory regions reduces discharge in neurons located in the locus coeruleus and the anatomical equivalent of the midbrain locomotor region. *Journal of Neuroscience* 20: 8551-8558.

- Mills C, Nguyen T, Tanga F, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Gomez E, Salyers A, Bannon A. (2013). Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats. *Eur J Pain*. 4 :469-79.
- Moldofsky H. Sleep and pain. 2001. *Sleep Medicine Reviews* 5: 385-396.
- Montell C, Rubin G. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323.
- Morin C, Gibson D, Wade J. 1998. Self-Reported sleep and mood disturbance in chronic pain patients. *The Clinical Journal of Pain* 14: 311-314.
- Nakamura S, Atsuta Y. 2004. Electrophysiological study on primary afferent properties of a chronic constriction nerve injury model in spinal rats. *Journal of Orthopaedic Science* 9: 386-391.
- Namkung W, Phuan P, Verkman A. 2011. TMEM16A Inhibitors Reveal TMEM16A as a Minor Component of Calcium-activated Chloride Channel Conductance in Airway and Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 286: 2365-2374.
- Nascimento D, Andersen M, Hipólido C, Nobrega J, Tufik S. 2007. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain  $\mu$ -opioid receptors. *Behavioral Brain Research* 178: 216-220.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2017. *Brain Basics: Understanding Sleep*.
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology* 82: 163-201.
- Newton R, Bingham S, Case P, Sanger G, Lawson S. 2001. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Molecular Brain Research* 95: 1-8.

- Odegard S, Omland P, Nilsen K, Stjern M, Gravdahl G, Sand T. 2015. The effect of sleep restriction on laser evoked potentials, thermal sensory and pain thresholds and suprathreshold pain in healthy subjects. *Clinical Neurophysiology* 126: 1979-87.
- Okifuji A, Hare B. 2011. Do sleep disorders contribute to pain sensitivity? *Current Rheumatology Reports* 13: 528-34.
- Onen S, Alloui A, Gross A, Eschallier A, Dubray C. 2001. The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *Journal of Sleep Research* 10: 35-42.
- Onen H, Alloui A, Jourdan D, Eschallier A, Dubray C. 2001b. Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Research* 900: 261-267.
- Ortega-Alvaro A, Berrocoso E, Rey-Brea R, Leza J, Mico J. 2012. Comparison of the antinociceptive effects of ibuprofen arginate and ibuprofen in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Life Sciences* 90: 13-20.
- Patchev V, Felszeghy K, Korányi L. 1991. Neuroendocrine and neurochemical consequences of a long-term sleep deprivation in rats: similarities to some features of depression. *Homeostasis* 33: 97-108.
- Payne J, Rivera C, Voipio J, Kaila K. 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences* 26:199-206.
- Phillips G, Cousins M. 1986. Neurological mechanisms of pain and the relationship of pain, anxiety, and sleep. En MJ Cousins, GD Phillips. *Acute pain management*. New York: Churchill Livingstone: 21-48.
- Pineda-Farias J, Barragán-Iglesias P, Loeza-Alcocer E, Torres-López J, Rocha-González H, Pérez-Severiano F, Delgado-Lezama R, Granados-Soto V.

2015. Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats. *Molecular Pain* 11: 41.
- Price T, Cervero F, De Koninck Y. 2005. Role of cation-chloride cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5: 547-555.
- Price T, Cervero F, Gold M, Hammond D, Prescott S. 2009. Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews* 60: 149-170.
- Ram A, Pandey H, Matsumura H, Kasahara-Orita K, Nakajima T, Takahata R, Satoh S, Terao A, Hayaishi O. 1997. CSF levels of prostaglandins, especially the level of prostaglandin D2, are correlated with increasing propensity towards sleep in rats. *Brain Research* 751: 81-89.
- Raouf R, Quick K, Wood J. 2010. Pain as a channelopathy. *Journal of Clinical Investigation* 120: 3745-3752.
- Ribeiro J, Sebastiao A, de Mendonca A. 2002. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology* 68: 377-392.
- Rechtschaffen A, Bergmann B. 1995. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behavioural Brain Research* 69: 55-63.
- Roehrs T, Hyde M, Blaisdell B, Greenwald M, Roth T. 2006. Sleep loss and REM sleep loss are hyperalgesic. *Sleep* 29: 145-51.
- Roehrs T, Harris E, Randall S, Roth T. 2012. Pain sensitivity, recovery from mild chronic sleep loss. *Sleep* 35: 1667-72.
- Sawynok J. 1998. Adenosine receptor activation and nociception. *European Journal of Pharmacology* 347: 1-11.
- Schafers M, Geis C, Svensson C, Luo Z, Sommer C. 2003. Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary

- afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *European Journal of Neuroscience* 17: 791-804.
- Schafers M, Sorkin L, Geis C, Shubayev V. 2003b. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neuroscience Letters* 347: 179-182.
- Schilling T, Eder C. 2009. Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. *Journal of Neuroimmunology* 216: 118-121.
- Scholz J, Woolf C. 2002. Can we conquer pain? *Nature* 5: 1062-1067.
- Schwartz J, Roth T. 2008. Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications. *Current Neuropharmacology* 6: 367-378.
- Shapiro C, Girdwood P. 1981. Protein synthesis in rat brain during sleep. *Neuropharmacology* 20: 457-460.
- Shortland P, Baytug B, Krzyzanowska A, McMahon S, Priestley J, Averill S. 2006. ATF3 expression in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve transection. *European Journal of Neuroscience* 23: 365-373.
- Sills G. 2006. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Current Opinion in Pharmacology* 6: 108-113.
- Smith M, Perlis M, Smith M, Giles D, Carmody T. 2000 Sleep quality and presleep arousal in chronic pain. *Journal of Behavioral Medicine*. 23: 1-13.
- Smith M, Edwards R, McCann U, Haythornthwaite J. 2007. The effects of sleep deprivation on pain inhibition and spontaneous pain in women. *Sleep* 30: 494-505.

- Smutzer G, Devassy R. 2016. Integrating TRPV1 Receptor Function with Capsaicin Psychophysics. *Advances in Pharmacological Sciences* 8: 116.
- Socala K, Wlaz P. 2016. Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of  $\alpha$ -spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonistic effects, in mice *Behavioural Brain Research* 303: 19-25.
- Souza F, Silva J. 2004. Avaliação e mensuração de dor em contextos clínicos e de pesquisa. *Revista Dor* 5: 408-429.
- Steeds C. 2016. The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)* 27: 507-511.
- Steriade M, McCarley R. 1990. Brainstem Control of Wakefulness and Sleep. *Neuroscience* 42: 309-324.
- Stickgold R, Walker M. 2007. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. *Sleep Medicine* 8: 331-343.
- Suchecki D, Tufik S. 2000. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiology & Behavior* 68: 309-316.
- Sung K, Kirby M, McDonald M, Lovinger D, Delpire E. 2000. Abnormal GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *Journal of Neuroscience* 20: 7531-7538.
- Szallasi, A, and Blumberg, P. M. 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacology Reviews* 51: 159-212.
- Szallasi A, Cortright D, Blum C, Eid R. 2007. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonists proof-of-concept. *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 357-372.

- Ta C, Adomaviciene A, Rorsman N, Garnett H, Tammaro P. 2016. Mechanism of allosteric activation of TMEM16A/ANO1 channels by a commonly used chloride channel blocker 173: 511-528.
- Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. 2015. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 5213-5218.
- Talbot S, Dias J, Lahjouji K, Bogo M, Campos M, Gaudreau P, Couture R. 2012. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia. *Journal of Neuroinflammation* 9: 16.
- Thakkar M, Mallick B. 1991. Effect of REM sleep deprivation on rat brain acetylcholinesterase. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 39: 211-214.
- Todd A. 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience* 11: 823-836.
- Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, Matera M, Geppetti P, Bianchi A. 2001. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *Journal of Neuroscience* 21: 1104-1109.
- Tominaga M, Caterina M, Malmberg A, Rosen T, Gilbert H, Skinner K, Raumann B, Basbaum A, Julius D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543.
- Tonini G. 2005. Regular sleep regulation. *Sleep medicine* 6: 575-576.
- Tracey I, Mantyh P. 2007. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 55: 337-391.
- Tseng T, Hsieh Y, Ko M, Hsieh S. 2014. Redistribution of voltage-gated sodium channels after nerve decompression contributes to relieve neuropathic pain chronic constriction injury.

- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K, 2000. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 170-182.
- Tsuzuki K, Kondo E, Fukuoka T, Yi D, Tsujino H, Sakagami M, Noguchi K. 2001. Differential regulation of P2X(3) mRNA expression by peripheral nerve injury in intact and injured neurons in the rat sensory ganglia. *Pain* 91: 351-360.
- Tufik S, Troncone L, Braz S, Silva-Filho A, Neumann B. 1987. Does REM sleep deprivation induce subsensitivity of presynaptic dopamine or postsynaptic acetylcholine receptors in the rat brain? *European Journal of Pharmacology* 140: 215-219.
- Ukponmwan E, Ruprecht J, Dzoljic M. 1984. REM sleep deprivation decreases the antinociceptive property of enkephalinase-inhibition, morphine and cold-water-swim. *General Pharmacology* 15: 255-258.
- Ukponmwan O, Ruprecht J, Dzoljic M. 1986. An analgesic effect of enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 332: 376-379.
- Valtschanoff J, Rustioni A, Guo A, Hwang S. 2001. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology* 436: 225-235.
- Van Hulzen Z, Coenen A. 1981. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiology & Behavior* 27: 741-744.
- Verkamn A, Galletta L. 2009. Chloride channels as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 153-171.
- Vitiello M, McCurry S, Shortreed S, Baker L, Rybarczyk B, Keefe F, Von Koff M. 2014. Short-term improvement in insomnia symptoms predicts long-term

- improvements in sleep, pain, and fatigue in older adults with comorbid osteoarthritis and insomnia. *PAIN* 155: 1547-1554.
- Volkow N, Tomasi D, Wang G. 2009. Hyperstimulation of striatal D2 receptors with sleep deprivation: implications for cognitive impairment. *Neuroimage* 45: 1232-1240.
- Watabiki T, Kiso T, Tsukamoto M, Aoki T, Matsuoka N. 2011. Intrathecal administration of AS1928370, a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34: 1105-1108.
- Waxman S, Dib-Hajj S, Cummins T, Black JA. 1999. Sodium channels and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7635-7639.
- Wei H, Zhao W, Wang Y, Pertovaara A. 2007. Pain-related behavior following REM sleep deprivation in the rat: Influence of peripheral nerve injury, spinal glutamatergic receptors and nitric oxide. *Brain Research* 1148: 105-112.
- Wei H, Ma A, Wang Y, Pertovaara A. 2008. Role of spinal 5-HT receptors in cutaneous hypersensitivity induced by REM sleep deprivation. *Pharmaceutical Research* 57: 469-475.
- Wei H, Gong N, Huang J, Fan H, Ma A, Li X, Wang Y, Pertovaara A. 2013. Spinal D-amino acid oxidase contributes to mechanical pain hypersensitivity induced by sleep deprivation in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 111: 30-36.
- Willis W. 1999. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes, a double-edged sword. *Experimental Brain Research* 124: 395-421.
- Wilson K, Eriksson M, D'Eon J, Mikail S, Emery P. 2002. Major depression and insomnia in chronic pain. *Clinical Journal of Pain* 18: 77-83.

- Woolf C, Salter M. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-1768.
- Woolf C. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine* 140: 441-451.
- Woolf C, Ma Q. 2007. Nociceptors – Noxious stimulus detectors. *Neuron* 55: 353-64.
- Woolf C. 2010. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation* 120: 3742-3744.
- Wodarski R, Schuh-Hofer S, Yurek D, Wafford K, Gilmour G, Treede R, Kennedy J. 2015. Development and pharmacological characterization of a model of sleep disruption-induced hypersensitivity in the rat. *European Journal of Pain* 19: 554-566.
- Yang K, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M. 1998. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neuroscience Letters* 255: 135-138.
- Yang Y, Cho H, Koo J, Tak M, Cho Y. 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium dependent chloride conductance. *Nature* 455: 1210-1216.
- Yarnitsky D. 2010. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Current Opinion in Anesthesiology* 23: 611-15.
- Youngblood B, Zhou J, Smagin G, Ryan D, Harris R. 1997. Sleep deprivation by the 'flower pot' technique and spatial reference memory. *Physiology and Behavior* 61: 249-256.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110.