



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

Departamento de Farmacobiología

**PARTICIPACIÓN DE LOS CO-TRANSPORTADORES NKCC1 Y KCC2 EN
UN MODELO DE FIBROMIALGIA EN RATAS**

Tesis que presenta

Q.F.B. Erick Josué Rodríguez Palma

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de la Tesis: **Dr. Vinicio Granados Soto**

Ciudad de México

Agosto, 2018

La parte experimental de este trabajo se realizó en el laboratorio de neurobiología del dolor (No. 12) del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de I.N.P (Sede sur). Este trabajo estuvo bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de maestría No. 615618

A Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida, por darme la oportunidad de conocer y rodearme de personas maravillosas.

Al CINVESTAV-Unidad Coapa por permitirme formar parte de su matrícula estudiantil.

Al CONACYT por la beca recibida durante la realización de la maestría.

Al Dr. Vinicio Granados Soto por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por todos sus consejos. Los cuales, me han permitido crecer personal y académicamente.

Agradezco a mi comité sinodal a la Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo, al Dr. Rodolfo Delgado Lezama y al Dr. Francisco S. Mercado Acá por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer mi proyecto de maestría.

A mis amigos del laboratorio 12 por ayudarme y apoyarme en todo momento ¡Gracias!. Especialmente a las M.C. Ana Belén, Yarim, Úrzula y Lupita Vidal por su enorme ayuda en la parte experimental de mi tesis, por compartir conmigo todos sus consejos, conocimientos y experiencias; pero sobre todo por su amistad ¡MUCHISIMAS GRACIAS CHICAS!.

A Saúl Huerta de la Cruz por seguir compartiendo la pasión por la ciencia, por apoyarme y alentarme a seguir mejorando día con día y por nunca dejarme solo en los momentos más difíciles. Gracias por todas las aventuras que hemos pasado y que seguiremos compartiendo ¡MUCHISIMAS GRACIAS POR SIEMPRE ESTAR AHÍ!.

A mis amigos que hicieron aún más divertida la maestría y con quienes disfrute tantos momentos felices: Dr. David Centurión, Dra. Aracely Sánchez, Saúl, Grecia, Geovanna, Cindy, Adriana, Carolina, Erika Gutiérrez, Lupita, Lau, Erika Curiel y Adrián.

A los integrantes de los laboratorios 4, 6, 11 y 16 por facilitarme sus equipos para la realización de mis experimentos ¡Gracias!.

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

A Sr. Ramón Martínez y a todo el personal del bioterio por su amabilidad y facilitarme los animales con los que se realizaron los experimentos del presente trabajo.

A mis padres **Emilio Rodríguez** y **Ana Laura Palma** por siempre apoyarme y alentarme a seguir superándome cada día.

A mi hermana **Nancy Rodríguez** por siempre estar ahí y hacer mis días aún más felices.

A mi abuelita y tíos por nunca dejar que me rindiera.

LOS AMO A TODOS.

Thinking is the hardest work there is,
which is probably the reason
why so few engage in it.

~ Henry Ford~

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | viii |
| RESUMEN..... | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Dolor..... | 1 |
| 1.2 Nocicepción | 1 |
| 1.3 Clasificación de los nociceptores..... | 3 |
| 1.4 Clasificación del dolor | 5 |
| 1.5 Modulación ascendente del dolor | 8 |
| 1.6 Vías descendentes del dolor..... | 9 |
| 1.7 Sensibilización | 12 |
| 1.7.1 Sensibilización periférica | 12 |
| 1.7.2 Sensibilización central | 15 |
| 1.7.3 Sensibilización mediada por el receptor NMDA..... | 15 |
| 1.7.4 Sensibilización mediada por la interacción neurona-microglía | 16 |
| 1.7.5 Sensibilización mediada por cambios en el sistema GABAérgico | 18 |
| 1.8 Inhibición y desinhibición espinal..... | 18 |
| 1.9 El cloruro en la regulación sináptica | 20 |
| 1.9.1 Inhibición pre-sináptica: participación del co-transportador NKCC1 en la nocicepción..... | 20 |
| 1.9.2 Inhibición post-sináptica: participación del co-transportador KCC2 en la nocicepción..... | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Antecedentes particulares | 34 |
| 2.1 Fibromialgia..... | 34 |
| 2.2 Patogénesis de la fibromialgia | 34 |
| 2.3 Modelos animales para el estudio de la fibromialgia | 40 |
| 2.3.1 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina | 41 |
| 2.4 Participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 en el dolor funcional..... | 43 |
| 3. Justificación | 45 |
| 4. Hipótesis..... | 46 |
| 5. Objetivo general..... | 46 |
| 6. Objetivos particulares | 46 |
| 7. Materiales y métodos | 47 |
| 7.1 Animales..... | 47 |
| 7.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina | 47 |
| 7.3 Evaluación de la alodinia táctil..... | 47 |
| 7.4 Evaluación del umbral de presión muscular | 48 |
| 7.5 Evaluación de la fatiga muscular | 48 |
| 7.6 Fármacos..... | 49 |
| 7.7 Determinación de la expresión de los co-transportadores NKCC1 y KCC2..... | 49 |
| 7.7.1 Obtención de tejidos..... | 49 |
| 7.7.2 Western blot | 50 |
| 7.8 Análisis de datos y estadística..... | 51 |
| 8. Diseño experimental..... | 52 |
| 8.1 Estandarización del modelo de fibromialgia..... | 52 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 8.2 | Caracterización de la fatiga muscular | 52 |
| 8.3 | Evaluación farmacológica | 53 |
| 8.4 | Determinación de la expresión de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 por western blot | 55 |
| 9. | Resultados..... | 56 |
| 9.1 | Estandarización del modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina | 56 |
| 9.2 | Caracterización de la fatiga muscular en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina | 59 |
| 9.3 | Efecto de la administración de bumetanida sobre la alodinia táctil.. | 62 |
| 9.4 | Efecto de la administración de furosemida sobre la alodinia táctil... | 62 |
| 9.5 | Efecto de la administración de CLP-257 sobre la alodinia táctil | 65 |
| 9.6 | Efecto de la administración de bumetanida, CLP-257 y furosemida sobre la hiperalgesia muscular..... | 65 |
| 9.7 | Efecto de la co-administración de bumetanida o furosemida más CLP-257 en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina 68 | |
| 9.8 | Efecto de la administración de bumetanida, CLP-257 y furosemida en ratas naïve..... | 71 |
| 9.9 | Determinación de la expresión de la proteína NKCC1 y KCC2 en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina | 72 |
| 10. | Discusión..... | 74 |
| 10.1 | La reserpina produce hipersensibilidad generalizada en ratas hembras y machos | 74 |
| 10.2 | La reserpina induce conductas tipo fatiga en ratas hembras | 76 |
| 10.3 | Los co-transportadores de cloruro participan en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por reserpina | 78 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 10.4 | Los co-transportadores de cloruro participan en el mantenimiento de la hiperalgesia muscular inducida por reserpina | 82 |
| 10.5 | La reserpina produce cambios en la expresión de la proteína de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 | 82 |
| 11. | Conclusión | 85 |
| 12. | Perspectivas | 86 |
| 13. | Referencias..... | 87 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1 Percepción del dolor. | 3 |
| Fig. 2 Dolor nociceptivo | 6 |
| Fig. 3 Dolor inflamatorio..... | 7 |
| Fig. 4 Dolor neuropático..... | 7 |
| Fig. 5 Dolor funcional. | 8 |
| Fig. 6 Vías y áreas cerebrales implicadas en el procesamiento del dolor..... | 11 |
| Fig. 7 Sensibilización periférica..... | 14 |
| Fig. 8 Sensibilización central..... | 17 |
| Fig. 9 Inhibición post-sináptica..... | 31 |
| Fig. 10 Diseño experimental de la evaluación conductual correspondiente al modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina..... | 52 |
| Fig. 11 Diseño experimental de la evaluación de la fatiga muscular en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina..... | 53 |
| Fig. 12 Diseño experimental de la evaluación antialodínica y antihiperalgésica de los fármacos en ratas tratadas con reserpina. | 54 |
| Fig. 13 Diseño experimental de la evaluación del efecto de los fármacos en ratas naïve. | 54 |
| Fig. 14 Diseño experimental de la extracción de tejido para <i>western blot</i> | 55 |
| Fig. 15 Curso temporal de la alodinia (A) e hiperalgnesia (B) en ratas hembras. | 57 |
| Fig. 16 Curso temporal de la alodinia (A) e hiperalgnesia (B) en ratas machos. | 58 |
| Fig. 17 Curso temporal de la alodinia e hiperalgnesia en ratas machos y hembras..... | 60 |
| Fig. 18 Efecto de la administración de reserpina sobre la conducta de ambulación en ratas hembras en la prueba de campo abierto. | 61 |
| Fig. 19 Efecto de la bumetanida sobre la alodinia táctil..... | 63 |
| Fig. 20 Efecto de la furosemida sobre la alodinia táctil..... | 64 |
| Fig. 21 Efecto del CLP-257 sobre la alodinia táctil..... | 66 |

| | |
|--|----|
| Fig. 22 Efecto de bumetanida, CLP-257 y furosemida sobre la hiperalgesia muscular. | 67 |
| Fig. 23 Efecto de la co-administración de bumetanida y CLP-257 sobre la alodinia táctil. | 69 |
| Fig. 24 Efecto de la co-administración de furosemida y CLP-257 sobre la alodinia táctil.. | 70 |
| Fig. 25 Efecto de la bumetanida, CLP-257 y furosemida sobre el umbral de retiro en ratas naïve. | 71 |
| Fig. 26 Expresión de la proteína NKCC1 en los GRDs. | 72 |
| Fig. 27 Expresión de la proteína KCC2 en la médula espinal. | 73 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Estudios sobre la participación del co-transportador NKCC1 en el dolor..... | 24 |
| Tabla 2. Estudios sobre la participación del co-transportador KCC2 en el dolor | 32 |
| Tabla 3. Tratamiento farmacológico de la fibromialgia..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| [Cl⁻]_i | Concentración intracelular de cloruro |
| 5-HT | Serotonina |
| ACR | Colegio americano de reumatología |
| ACTH | Hormona adrenocorticotropa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADRB2 | Receptor adrenérgico β 2 |
| AINES | Antiinflamatorios no esteroides |
| AMPA | Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ASIC | Canales sensibles a ácido |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| CCI | Constricción crónica del nervio ciático |
| CFA | Adyuvante completo de Freund |
| CGRP | Péptido relacionado al gen de la calcitonina |
| Cl⁻ | Cloruro |
| CNR1 | Receptor cannabinoide tipo 1 |
| COMT | Catecol-O-metiltransferasa |
| CORT | Corticosterona |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EE | Error estándar |
| EP₂ | Receptor a prostaglandinas 2 |
| EPSCs | Corrientes post-sinápticas excitadoras |
| ERK | Cinasa regulada por señales extracelulares |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |

| | |
|---|--|
| Fig | Figura |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GABA_A | Receptor GABA _A |
| GABA_A α_5 | Receptor GABA _A con la subunidad α_5 |
| GABA_A α_6 | Receptor GABA _A con la subunidad α_6 |
| GCH1 | Ciclohidrolasa guanosín-trisfosfato |
| GDNF | Factor neutrófico derivado de la glía |
| GRD | Ganglio de la raíz dorsal |
| GT | Ganglio trigeminal |
| H⁺ | Protón |
| HMGB1 | High mobility group box 1 |
| HPA | Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal |
| HTR2A | Gen del receptor 5-HT _{2A} |
| i.t. | Intratecal |
| IASP | Asociación internacional para el estudio del dolor |
| IB4 | Isolectina B4 |
| IL-1β | Interleucina 1- β |
| IL-6 | Interleucina 1-6 |
| IPSC | Corrientes post-sinápticas inhibitoras |
| JNK | Cinasa c-jun N-terminal |
| KCC2 | Co-transportador K ⁺ -Cl ⁻ 2 |
| KO | <i>Knock out</i> |
| LPS | Lipopolisacárido |
| ME | Médula espinal |
| Nav 1.7 | Canal de sodio dependiente de voltaje 1.7 |
| Nav 1.8 | Canal de sodio dependiente de voltaje 1.8 |
| Nav 1.9 | Canal de sodio dependiente de voltaje 1.9 |
| NF-$\kappa$$\beta$ | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NGF | Factor de crecimiento neural |

| | |
|------------------------|--|
| NKCC1 | Co-transportador $N^+-K^+-Cl^-$ 1 |
| NLRP3 | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain- like receptor</i> |
| NMDA | Receptor N-metil-D-aspartato |
| OSR1 | Cinasa responsiva a estrés oxidativo 1 |
| P2X3 | Receptor purinérgico 3 |
| P2X4 | Receptor purinérgico 4 |
| PAD | Despolarización de la aferente primaria |
| PAG | Sustancia gris periacueductual |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PI3k | Fosfoinositol 3-cinasa |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PVDF | Polifluoruro de vinilideno |
| PVN | Núcleo paraventricular |
| q-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RRD | Reflejo de la raíz dorsal |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| RVM | Medula rostral ventromedial |
| SBTI | Inhibidor de tripsina derivado de la soya |
| SCI | Daño a la médula espinal |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SERT | Transportador de serotonina |
| siRNA | RNA de interferencia |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| SP | Sustancia P |
| SPAK | Cinasa relacionada a la proteína estéril 20 rica en prolina-alanina ⁴ |

| | |
|--------------------------------|--|
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral α |
| TrKA | Cinasa A del receptor de tropomiosina |
| TrKB | Cinasa B del receptor de tropomiosina |
| TRL-4 | Receptor tipo Toll 4 |
| TRPA1 | Receptor de potencial transitorio ankyrina 1 |
| TRPC3 | Receptor de potencial transitorio C3 |
| TRPM8 | Receptor de potencial transitorio M8 |
| TRPV | Receptor de potencial transitorio |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitorio V1 |
| TRPV2 | Receptor de potencial transitorio V2 |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |

RESUMEN

La fibromialgia se caracteriza por la presencia de dolor músculo-esquelético generalizado para el cual no hay una causa definida. El presente estudio tuvo como objetivo determinar farmacológicamente la contribución de los co-transportadores de cloruro, NKCC1 y KCC2, en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina en ratas hembras. La administración de reserpina (1mg/kg/día durante 3 días) se utilizó para inducir fibromialgia en ratas Wistar hembras de 200-220 g. Se utilizaron los filamentos de von Frey para determinar la alodinia táctil y la prueba de Randall-Selitto para evaluar la hiperalgesia muscular. Los fármacos se administraron por vía intratecal. Todos los fármacos se administraron al quinto día post administración de reserpina. Además, se realizaron análisis de *Western blot* para determinar la expresión de la proteína de NKCC1 y KCC2 a los tiempos 0 y 1, 3, 5, 7, 10 y 14 días después de la administración de reserpina. La reserpina indujo alodinia táctil e hiperalgesia muscular generalizada presentando el mayor efecto al día 5 post-administración. La administración intratecal de bumetanida (100 µg) revirtió la alodinia táctil e hiperalgesia muscular. En contraste, la furosemida (300 µg) disminuyó la alodinia táctil y revirtió parcialmente la hiperalgesia muscular, en contraste, la administración intratecal de CLP-257 (50-300 µg) revirtió la alodinia táctil de manera dosis dependiente. Además, el CLP-257 (300 µg) incrementó el umbral de presión muscular en ratas reserpinizadas. En contraste, el vehículo no tuvo efecto sobre la alodinia táctil e hiperalgesia muscular en dicho modelo. La co-administración de bumetanida o furosemida (50 µg) más CLP-257 (50 µg) tuvieron un efecto de sumación sobre la alodinia táctil en dicho modelo. Por otra parte, la reserpina aumentó la expresión de NKCC1 al día 7 post-administración, mientras que la expresión KCC2 se disminuyó de manera dependiente del tiempo. Los datos sugieren que los co-transportadores KCC2 y NKCC1 contribuyen a la hipersensibilidad, alodinia táctil e hiperalgesia mecánica, observadas en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina en ratas hembras.

ABSTRACT

Fibromyalgia is characterized by the presence of widespread musculoskeletal pain for which no alternative cause has been identified. The aim of this study was to determine the contribution of KCC2 and NKCC1 co-transporters to the reserpine-induced fibromyalgia in female rats. Daily reserpine injections (1 mg/kg) during three consecutive days were used to induce fibromyalgia in 200-220 g female Wistar rats. Von Frey filaments were used to assess tactile allodynia. Randall-Selitto test was used to determine muscular hyperalgesia. Drugs were administered intrathecally. All drugs were administered 5 days post-reserpine administration. Besides, Western blot analysis were used to determined NKCC1 and KCC2 protein expression at baseline and 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days post-reserpine administration. Reserpine induce widespread tactile allodynia and muscular hyperalgesia, with a major effect at 5 days post-administration. Intrathecal administration of 100 μ g of bumetanide partially reversed tactile allodynia and muscular hyperalgesia. In contrast, 300 μ g of furosemide diminished tactile allodynia and partially reversed muscular hyperalgesia while 100 μ g slightly increased the withdrawal threshold. Furthermore, intrathecal administration of CLP-257 (50-300 μ g) reversed tactile allodynia in a dose-dependent manner. Moreover, 300 μ g of CLP-257 induced an increase of the muscle pressure threshold. In marked contrast, vehicle had no effect on either tactile allodynia or muscular hyperalgesia of reserpinized rats. All drugs and vehicle induced a transient decrease of withdrawal threshold and muscle pressure threshold in naïve rats. In addition, co-administration of bumetanide and furosemide with CLP-257 had an additive effect on tactile allodynia. On the other hand, reserpine enhanced NKCC1 expression 7 days post-administration. In addition, reserpine reduced KCC2 expression in a time-dependent manner. Data suggest that KCC2 and NKCC1 co-transporters contribute to the hypersensitivity (tactile allodynia and muscular hyperalgesia) observed in a reserpine-induced model of fibromyalgia in female rats.

1. Introducción

1.1 Dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define al dolor como *una experiencia sensorial y emocional desagradable relacionada con daño real o potencial a un tejido o descrito en términos de dicho daño* (Merskey y Bogduk, 1986). Por tal motivo, el dolor es una experiencia subjetiva, compleja e influenciada por varios factores tales como las emociones, el medio ambiente, el estado afectivo y las experiencias previas, entre otros factores (Berry et al., 2001). El dolor es un mecanismo de protección que alerta al organismo ante estímulos físicos, químicos o mecánicos que ponen en riesgo la integridad del individuo (Tracey y Mantyh, 2007).

El dolor es un problema de salud global y los costos asociados con dicha condición son altos, tanto para el sistema de salud como para la sociedad en general (Katz, 2002). Los efectos del dolor crónico son abrumadores en nuestra sociedad. Se estima que el dolor afecta alrededor del 25 al 29% de la población mundial. Si consideramos a la población mexicana, hasta el 2010, más de 28 millones de personas sufrían dolor crónico (Covarrubias-Gómez et al., 2010; Goldberg y McGee, 2011). Por tal motivo, el control del dolor mediante aproximaciones farmacológicas y no farmacológicas se ha convertido en un tema de interés a nivel mundial (Fairbanks y Goracke-Postle, 2015).

1.2 Nocicepción

La nocicepción es un conjunto de mecanismos neuronales mediante los cuales un estímulo nocivo proveniente de la periferia se transmite al sistema nervioso central (SNC) a través de los nociceptores. Los nociceptores son neuronas sensoriales capaces de transformar los estímulos nocivos (calor, frío o irritantes químicos) a señales eléctricas (Loeser y Treede, 2008).

Los cuerpos celulares de los nociceptores se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en el ganglio trigeminal (GT) y presentan un axón que se bifurca en una terminal periférica que inerva al órgano blanco y una terminal central que hace sinapsis en la médula espinal con neuronas de segundo orden (Basbaum et al., 2009; Berry et al., 2001).

La nocicepción comprende cuatro mecanismos (**Fig. 1**):

1. **Transducción:** este proceso involucra la conversión de los estímulos nocivos, censados por los nociceptores en las terminales nerviosas periféricas, en señales eléctricas.
2. **Transmisión:** es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las fibras nerviosas de las neuronas aferentes primarias.
3. **Modulación:** es un proceso que involucra la alteración de las señales nociceptivas dentro del asta dorsal de la médula espinal, con la finalidad de inhibir o amplificar las señales sensoriales.
4. **Percepción:** es la integración de los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia del dolor.

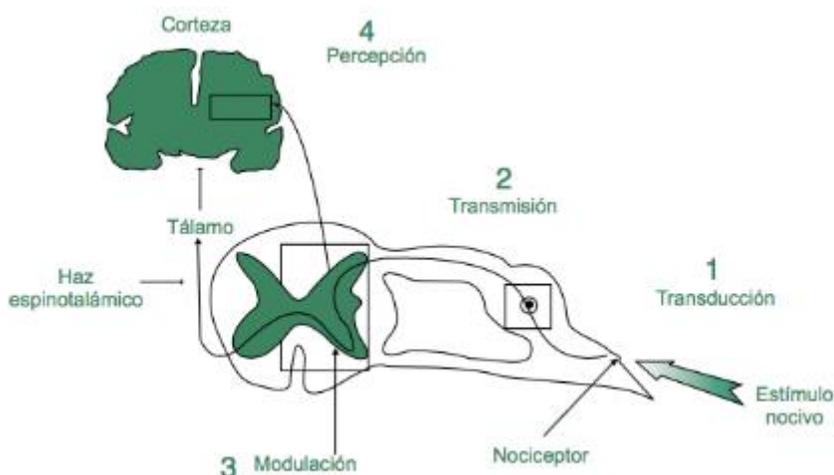


Fig. 1 Percepción del dolor. Procesamiento, percepción, transmisión y modulación de la experiencia dolorosa.

1.3 Clasificación de los nociceptores

Los nociceptores tienen la capacidad de detectar estímulos de alto umbral. Se distinguen tres tipos de nociceptores: 1) nociceptores mecanosensibles, los cuales están encargados de responder a estímulos mecánicos, tales como la presión muscular; 2) nociceptores mecanotérmicos encargados de censar cambios en la temperatura y pueden ser activados tanto por frío (receptor TRPM8) como por calor (receptor TRPV); y 3) nociceptores polimodales, los cuales tienen la capacidad de responder a distintos tipos de estímulos que incluyen estímulos mecánicos, térmicos o químicos, como los irritantes (receptor TRPV1). Todos los tipos de nociceptores mencionados se encuentran localizados en las terminales de las fibras aferentes primarias.

Por otra parte, las fibras aferentes primarias se clasifican de acuerdo a su nivel de mielinización, marcadores membranales y velocidad de conducción en:

Fibras A β : las fibras A β son fibras sensoriales de diámetro grande (más de 10 μm), se encuentran altamente mielinizadas y tienen una velocidad de

conducción de la información nociceptiva rápida (30-100 m/seg). Bajo condiciones normales las fibras A β responden a estímulos inocuos como presión, tacto y vibración, entre otros (Woolf y Doubell, 1994).

Fibras A δ : las fibras A δ son fibras sensoriales de calibre mediano con un diámetro de 2-6 μm , se encuentran ligeramente mielinizadas y presentan una velocidad de conducción intermedia (12-30 m/seg). Las fibras A δ tienen un campo receptivo pequeño y responden exclusivamente a estímulos mecánicos. Además, las fibras A δ median el dolor pasajero y punzante. Se distinguen dos subpoblaciones de fibras A δ :

Tipo I: las fibras sensoriales A δ tipo I responden a estímulos mecánicos y químicos intensos. Además, presentan un umbral de activación relativamente alto frente a estímulos térmicos (>53 °C).

Tipo II: las fibras sensoriales A δ tipo II responden preferencialmente al calor debido a su umbral térmico (43 °C). Sin embargo, también pueden responder a estímulos mecánicos.

Fibras C: las fibras C son fibras de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm) y amielinizadas. Por tal motivo, la conducción de la información nociceptiva es lenta (0.5-2 m/seg). Las fibras C tienen un campo receptivo mayor que las fibras A δ . Además, estas fibras son polimodales, es decir, se activan por estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Las sustancias químicas que estimulan a las fibras C son producidas como resultado de un daño celular, de una cascada inflamatoria o por la presencia de sustancias como bradicinina, histamina, acetilcolina, serotonina e iones hidrógeno. Las fibras C representan el 70% de los nociceptores y se clasifican en peptidérgicas y no peptidérgicas. Las fibras C peptidérgicas sintetizan y liberan neuropéptidos como la sustancia P (SP), el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y la

somatostatina. Además, expresan de manera específica la cinasa A del receptor de tropomiosina (TrkA) y los canales TRPV1, TRPV2, TRPA1 y TRPM8 (Basbaum et al., 2009; Woolf y Ma, 2007). Por su parte, las fibras C no peptidérgicas expresan la isolectina B4 (IB4), el receptor del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el receptor purinérgico P2X3 y los canales TRPC3 y Nav 1.9 (Woolf y Ma, 2007).

1.4 Clasificación del dolor

El dolor se divide en dos categorías: adaptativo y maladaptativo. El primero hace referencia a aquel tipo de dolor que permite la supervivencia del organismo, mientras que el segundo es el resultado de un funcionamiento anormal del sistema nervioso (Woolf, 2004). De acuerdo con el mecanismo neurofisiológico que origina el dolor, éste se clasifica en: nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional.

El dolor nociceptivo es una respuesta fisiológica adaptativa y necesaria para alertar al organismo sobre la presencia de estímulos dañinos (**Fig. 2**). Las neuronas sensoriales nociceptivas tienen un umbral de activación lo suficientemente alto para no interferir con las actividades diarias, pero suficientemente bajo para evocar una respuesta antes de que ocurra un daño al tejido (Woolf, 2010). El dolor nociceptivo tiene un origen somático y visceral. Dentro de este tipo de dolor se encuentra el dolor cutáneo caracterizado por ser agudo, punzante y de duración variable de acuerdo con el estímulo que lo genera. También se encuentra el dolor visceral que es el producto de la estimulación de los nociceptores localizados en los distintos órganos (Woolf, 2004, 2010).

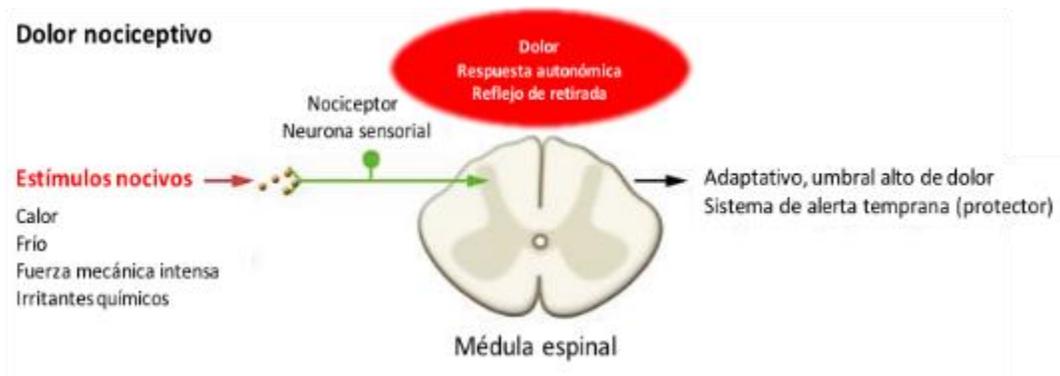


Fig. 2 Dolor nociceptivo. El sistema permite la detección de estímulos nocivos potencialmente dañinos para los tejidos. Modificado de Woolf, 2010.

El dolor inflamatorio es una respuesta fisiológica que se presenta cuando existe un daño tisular; por ejemplo, una incisión en la piel, quemaduras, frío extremo, fracturas, artritis e infecciones, entre otras (**Fig. 3**). El daño tisular induce inflamación y liberación de mediadores químicos tales como citocinas pro-inflamatorias, bradicinina, factores de crecimiento (factor de crecimiento nervioso, NGF), prostaglandinas (PGE_2), protones y sustancia P, entre otros, formando la sopa inflamatoria que activa las terminales nociceptivas periféricas; lo cual altera la sensibilidad de los nociceptores (Woolf, 2004; Woolf, 2010). Además, el estímulo inflamatorio provoca el reclutamiento, la acumulación y la activación de células del sistema inmune y proteínas plasmáticas en el área de la lesión.

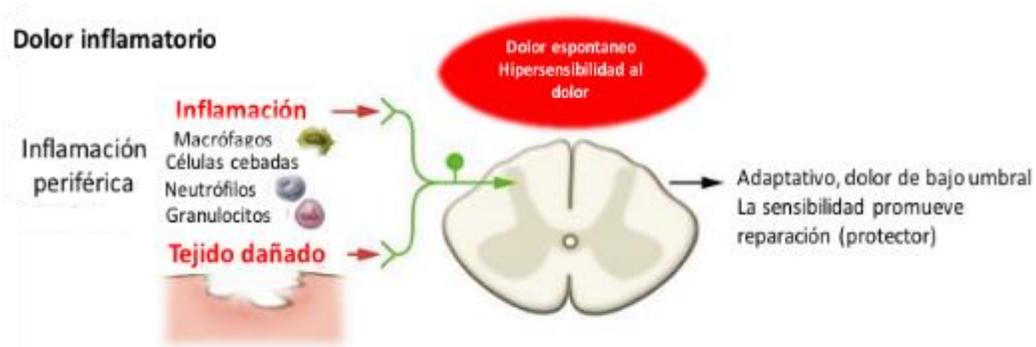


Fig. 3 Dolor inflamatorio. Este tipo de dolor está asociado con el daño al tejido y la infiltración de células del sistema inmune. Este tipo de dolor promueve la reparación del tejido debido a la presencia de hipersensibilidad. Modificado de

El dolor neuropático es una respuesta patológica que resulta de un daño o lesión al sistema somatosensorial (**Fig. 4**). Este tipo de dolor presenta múltiples causas que van desde lesiones físicas hasta polineuropatías metabólicas. Las neuropatías incluyen alteraciones del sistema nervioso como la neuralgia post-herpética, la polineuropatía relacionada con el VIH y las lesiones de los nervios y la médula espinal. Por tal motivo, el dolor neuropático varía dependiendo de su localización anatómica, así como de las causas que lo originan (Woolf, 2004).

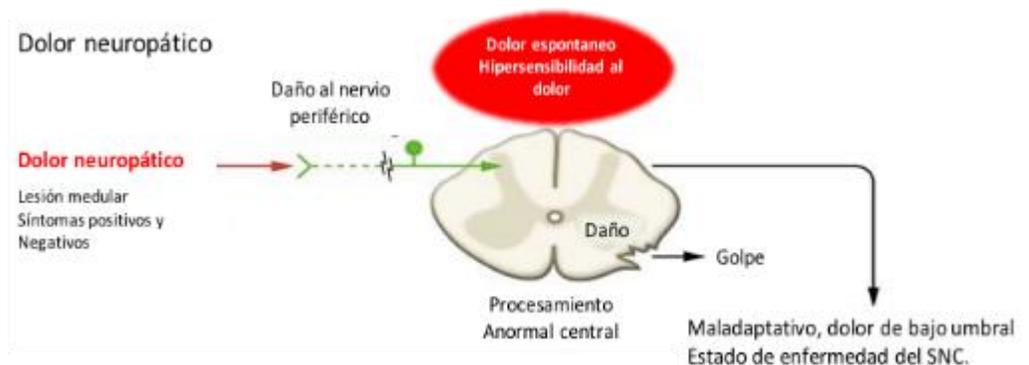


Fig. 4 Dolor neuropático. Este tipo de dolor es una respuesta dolorosa que se produce por la lesión o funcionamiento anormal del sistema somatosensorial. Modificado de Woolf, 2010.

El dolor funcional es una respuesta patológica que se caracteriza por la hipersensibilidad al dolor, aun cuando no existe una anomalía periférica o un déficit neurológico aparente (**Fig. 5**). El dolor funcional se asocia a un procesamiento anormal de la información nociceptiva (Woolf, 2004). Dentro de las afecciones que incluye este tipo de dolor se encuentran la fibromialgia, el síndrome de colon irritable, el dolor pélvico crónico y la enfermedad de la articulación temporomandibular, entre otros (Woolf, 2010).

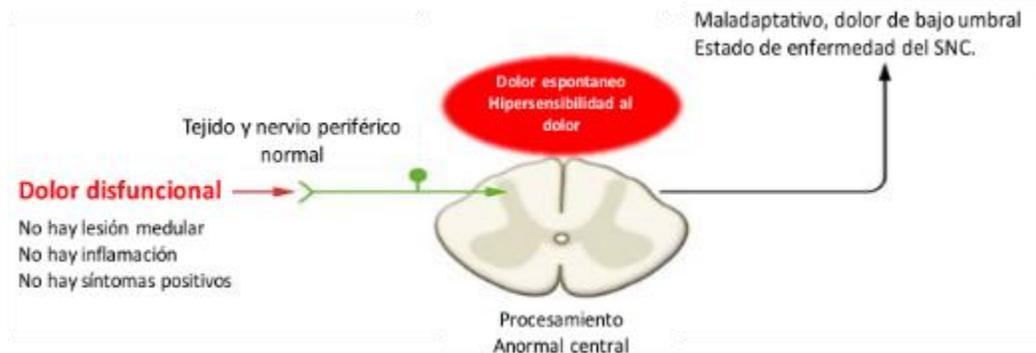


Fig. 5 Dolor funcional. Este tipo de dolor es una respuesta que se desarrolla debido un procesamiento central alterado. Modificado de Woolf, 2010.

1.5 Modulación ascendente del dolor

En la región dorsal de la médula espinal se realiza el relevo de la información nociceptiva entre las neuronas aferentes primarias y las neuronas de segundo orden. Además, el asta dorsal de la médula espinal es un sitio complejo debido al tipo de neuronas, circuitos neuronales, sinapsis y eventos bioquímicos presentes. Dentro de las funciones del asta dorsal de la médula espinal está la integración, selección y dispersión de los estímulos sensoriales.

Por otra parte, la médula espinal es el lugar donde se realiza la primera sinapsis en la vía nociceptiva y por lo tanto ofrece una amplia regulación de la

información sensorial a través de mecanismos segmentales y supra-espinales (Basbaum et al., 2009; Hunt y Mantyh, 2001).

La información nociceptiva se transmite al tálamo a través de las neuronas de segundo orden del tracto espinotalámico y al tallo cerebral mediante los tractos espinoreticular y espinomesencefálico. El tracto espinotalámico lateral llega directamente al núcleo ventral posterior del tálamo, mientras que el tracto espinotalámico medial envía proyecciones a la sustancia gris periacueductal (PAG) y al sistema reticular del mesencéfalo antes de llegar al núcleo medial del tálamo (Tracey y Mantyh, 2007) (**Fig. 6**). Las neuronas de tercer orden, cuyos cuerpos celulares se localizan en el tálamo, envían proyecciones hacia la corteza somatosensorial primaria y secundaria, responsables de la discriminación sensorial del dolor y hacia áreas del sistema límbico-cortical involucradas en la modulación del componente aversivo-emocional del dolor, como la corteza cingular anterior y la corteza insular (Brodin et al., 2016; Hunt y Mantyh, 2001).

Por otro lado, el tracto espinoreticular tiene su origen en las láminas profundas del asta dorsal de la médula espinal y envía proyecciones a la formación reticular, la cual a su vez envía proyecciones a la amígdala y otras áreas asociadas con el procesamiento emocional y cognitivo del dolor, tales como el núcleo accumbens, el hipocampo y la corteza prefrontal (Apkarian et al., 2005; Brodin et al., 2016; Millan, 2002; Tracey y Mantyh, 2007). Se sabe que, las proyecciones espinales hacia el tallo cerebral integran la actividad nociceptiva con procesos homeostáticos y autonómicos (Tracey y Mantyh, 2007). Además, estas proyecciones proporcionan información para estimular la respuesta de los sistemas descendentes del dolor (Almeida et al., 2004).

1.6 Vías descendentes del dolor

El sistema endógeno de modulación del dolor está formado por un circuito descendente de áreas corticales y subcorticales que consiste en dos

estructuras: la PAG y la médula rostral ventromedial (RVM) (Ossipov et al., 2010; Ossipov et al., 2014; Pertovaara y Almeida, 2006; Vanegas y Schaible, 2004). Los impulsos generados en el hipotálamo, tálamo, amígdala y corteza cingular anterior son integrados en la PAG, que envía proyecciones a la RVM y ahí a la médula espinal (**Fig. 6**). En este sentido, la RVM está formada por el núcleo magno del rafé y las formaciones reticulares serotoninérgicas adyacentes (Ossipov et al., 2014), así como de poblaciones de interneuronas GABAérgicas y glicinérgicas que presentan proyecciones hacia la médula espinal (Hossaini et al., 2012; Kato et al., 2006). La RVM también recibe entradas del tálamo, la región parabraquial y el *locus coeruleus* a través de neuronas noradrenérgicas, las cuales se comunican con la PAG (Millan, 2002; Ossipov et al., 2010; Ossipov et al., 2014).

La modulación descendente del dolor puede ser inhibidora y facilitadora, debido a la estimulación o inactivación de las neuronas de la RVM (Heinricher et al., 2009; Vanegas y Schaible, 2004). Con la prueba de retiro de la cola en ratas anestesiadas (Anderson et al., 1977; Fields et al., 1976, 1977) se identificó una población de neuronas en la RVM que incrementan el disparo de potenciales de acción justo antes del comienzo del reflejo nociceptivo, así como otra población de neuronas que reducen el disparo. Con base en lo anterior, estas neuronas se han clasificado como *ON*, *OFF* y *NEUTRAS* (Heinricher et al., 2009). Las neuronas *OFF* se encuentran tónicamente activas e inhiben la transmisión nociceptiva, mientras que las neuronas *ON* facilitan la transmisión nociceptiva; además hay una población de neuronas que no responden a estímulos nociceptivos, llamadas *NEUTRAS* (Ossipov et al., 2010). La existencia de neuronas *ON* y *OFF* propone que los sistemas descendentes inhibidores y facilitadores funcionan en armonía para mantener un procesamiento sensorial equilibrado. Por lo tanto, se piensa que bajo condiciones patológicas este balance podría alterarse y favorecer la facilitación y el incremento en la percepción del dolor (Ossipov et al., 2014; Vanegas y Schaible, 2004).

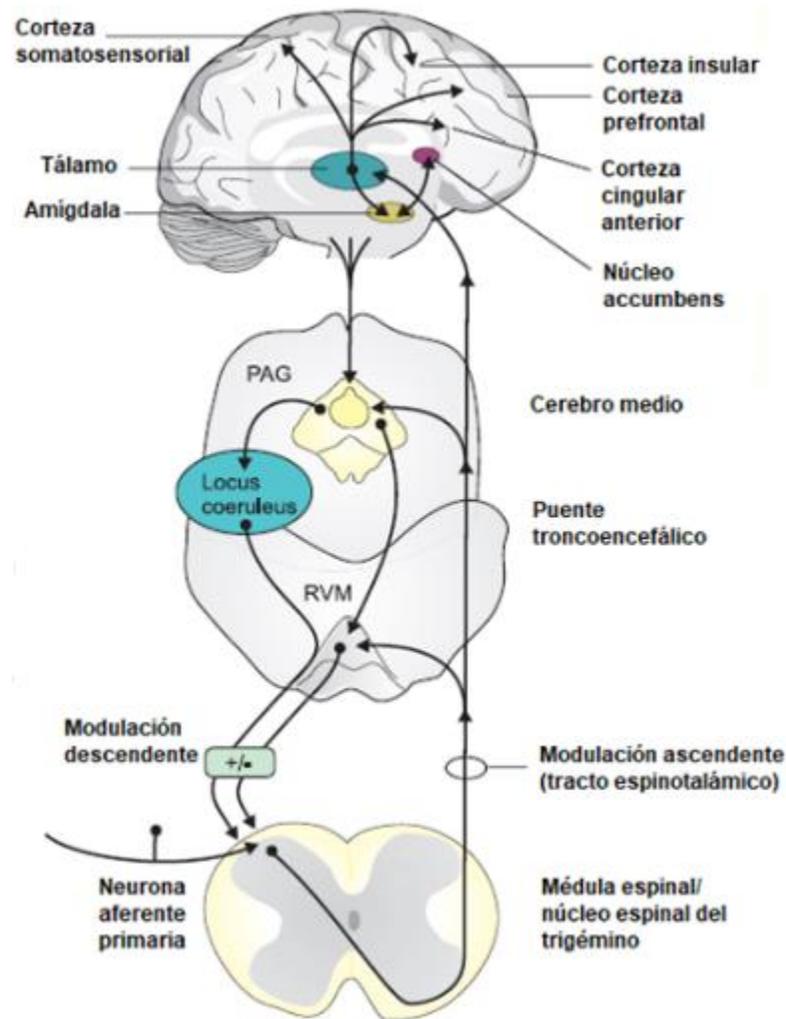


Fig. 6 Vías y áreas cerebrales implicadas en el procesamiento del dolor. Las neuronas aferentes primarias, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal o el ganglio trigémino, hacen sinapsis con neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal. Los axones de las neuronas de segundo orden proyectan hacia el tálamo y áreas subcorticales como la RVM y la PAG. Las neuronas de tercer orden proyectan desde el tálamo hacia la corteza somatosensorial y áreas límbico-corticales. También proyectan hacia la amígdala, que a su vez interactúa con el núcleo accumbens. Varias de estas regiones cerebrales envían proyecciones moduladoras descendentes a través de la vía PAG-RVM y el locus coeruleus, de vuelta hasta las neuronas aferentes primarias. Modificado de Brodin et al., 2016.

1.7 Sensibilización

Cuando ocurre un daño o inflamación a los tejidos se produce una estimulación repetida del sistema nociceptivo. Esto facilita que estímulos inocuos sean capaces de excitar a las neuronas periféricas; dicho fenómeno se conoce como sensibilización e involucra la activación de mecanismos transduccionales y se da tanto a nivel periférico como central (Woolf, 2004).

1.7.1 Sensibilización periférica

La sensibilización periférica es una forma de plasticidad estímulo-dependiente de los nociceptores (Woolf y Ma, 2007). En la sensibilización periférica, los estímulos son un conjunto de mediadores inflamatorios liberados a partir de células del sistema inmune o células dañadas. Esta sensibilización reduce el umbral de activación de las fibras aferentes primarias e incrementa su capacidad de respuesta (Basbaum et al., 2009; Woolf y Ma, 2007). Como resultado, un estímulo de baja intensidad logra acceder a vías nociceptivas y producir dolor (Woolf y Ma, 2007). La lesión tisular induce la infiltración de células del sistema inmune como células cebadas, plaquetas, basófilos, neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. Estas células junto con las células residentes dañadas liberan mediadores inflamatorios como citosinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), quimiocinas, serotonina, bradicinina, histamina, óxido nítrico, PGE₂, ATP y protones, entre otros (**Fig. 7**) (Basbaum et al., 2009; Woolf y Ma, 2007). Dichos mediadores actúan sobre sus respectivos receptores localizados en la terminal periférica de las fibras aferentes primarias, induciendo la activación de segundos mensajeros y múltiples cascadas de señalización que involucran a la proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA), fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína cinasa activada por señales extracelulares (ERK), cinasa p38 y la cinasa C-jun N-terminal (JNK). La activación de estas vías de señalización aumenta la transcripción de genes y la síntesis de receptores como TRPV1 y canales de sodio dependientes de

voltaje (Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9), principalmente. Los receptores se transportan a la terminal periférica, donde son fosforilados por diversas cinasas, provocando la alteración de su umbral y cinética de activación. Lo anterior aumenta las corrientes de sodio en la terminal periférica, de manera que un estímulo despolarizante provoca un mayor número de potenciales de acción en la terminal periférica (Basbaum et al., 2009; Stein et al., 2009; Costigan y Woolf, 2000; Woolf y Ma, 2007).

Los mediadores inflamatorios pueden generar directamente dolor. Sin embargo, la mayoría de los mediadores sensibilizan la terminal periférica (Woolf, 2004). Por ejemplo, la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2) convierte el ácido araquidónico en prostaglandina H, que posteriormente es transformada en prostanoides específicos como la PGE₂ (Ma et al., 2010; Norberg et al., 2013). La PGE₂ y otros mediadores como, la serotonina y la bradicinina, favorecen el aumento de la excitabilidad debido a la entrada de calcio a las neuronas sensoriales, lo cual activa a la PKC (Linhart et al., 2003). Por su parte, la PGE₂ se une a los receptores EP₂, los cuales se encuentran acoplados a cinasas intracelulares como PKA y PKC (Ma et al., 2010). Estas cinasas fosforilan los aminoácidos serina y treonina de diversos canales y receptores alterando su actividad, de manera que se vuelven hipersensibles ante estímulos subsecuentes (Woolf, 2004).

Por otro lado, la activación de los nociceptores genera potenciales de acción antidrómicos que provocan la liberación de neuropéptidos como SP y CGRP de las terminales periféricas. La unión de dichos neuropéptidos a sus receptores induce la relajación del musculo liso vascular y por lo tanto vasodilatación y extravasación plasmática. Lo anterior recluta más células del sistema inmune contribuyendo a perpetuar la inflamación y la hiperexcitabilidad (Costigan y Woolf, 2000). Además, el glutamato liberado de las neuronas sensoriales primarias activa a los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) localizados en las células satélite, estas células liberan citocinas

proinflamatorias que contribuyen al proceso de sensibilización (Ferrari et al., 2014).

Finalmente, la inflamación genera cambios que incrementan la transmisión nociceptiva en las terminales periféricas, lo cual contribuye al desarrollo de la sensibilización en las terminales centrales (Costigan y Woolf, 2000; Woolf y Ma, 2007).

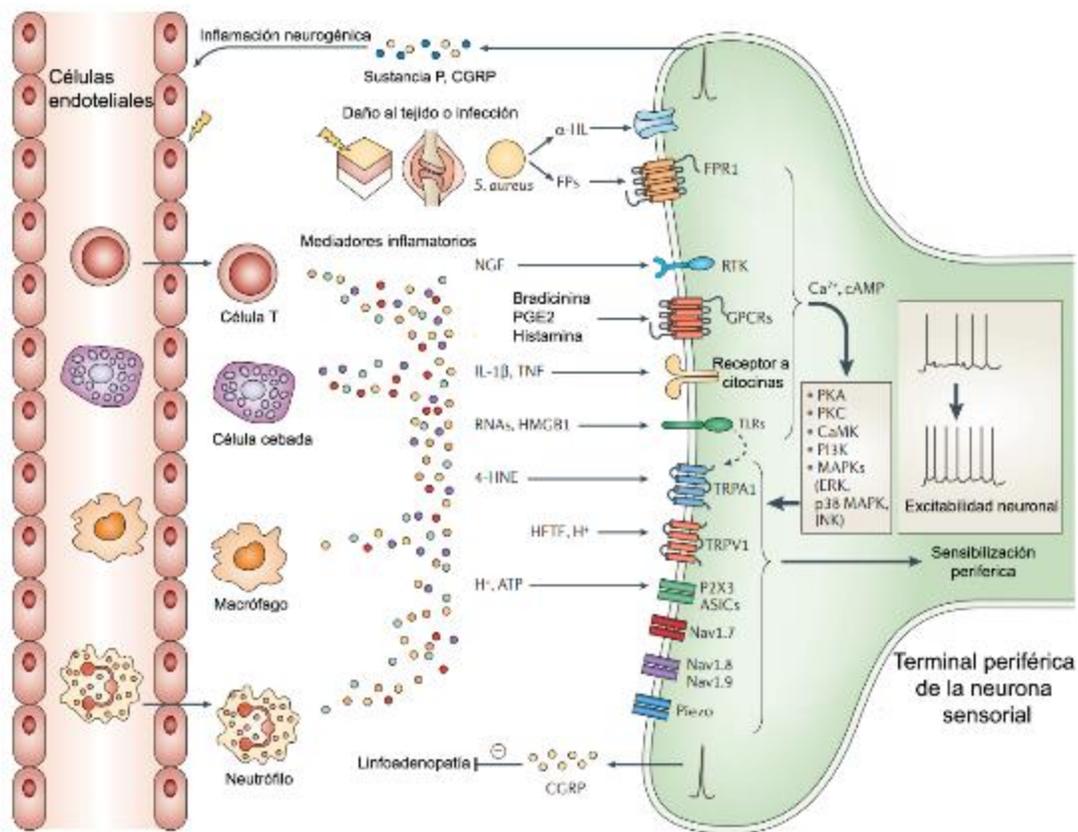


Fig. 7 Sensibilización periférica. El daño al tejido y las infecciones producen inflamación a través de la extravasación e infiltración de células del sistema inmune. Las células infiltradas y residentes liberan diversos mediadores inflamatorios como bradicnina, prostaglandinas, protones, ATP, citosinas (IL-1 β) y quimiocinas proinflamatorias, PGE2 (prostaglandina E2), HETE (Ácido 5-hidroxeicosatetraenoico), 4-HNE (4-hidroxinonenal), α -HL (hemolisina alfa) y FPs (péptidos formilados). Tomado de Ji et al., 2014

1.7.2 Sensibilización central

La sensibilización central es un proceso de hiperexcitabilidad dentro del SNC, debido al incremento en la excitabilidad neuronal y a la reducción en la función inhibitoria (Basbaum et al., 2009). El efecto neto de la sensibilización central es permitir la entrada de estímulos de baja intensidad a las vías nociceptivas del asta dorsal de la médula espinal generando un incremento en el número de potenciales de acción, así como la facilitación y potenciación de la información nociceptiva (Latremoliere y Woolf, 2010). La sensibilización central genera cambios en las propiedades de las neuronas nociceptivas del SNC. El dolor generado a consecuencia de dichos cambios alteran la forma en que el SNC responde a los estímulos sensoriales (Basbaum et al., 2009; Latremoliere y Woolf, 2010; Suzuki y Dickenson, 2005).

Diversos mecanismos han sido implicados en la sensibilización central. Por ejemplo, hiperexcitabilidad mediada por receptores NMDA, pérdida del control inhibitorio (desinhibición) e interacciones entre las células de la glía y las neuronas nociceptivas. Todos estos mecanismos se encuentran involucrados en el inicio o mantenimiento de la sensibilización central (**Fig. 8**) (Basbaum et al., 2009).

1.7.3 Sensibilización mediada por el receptor NMDA

El dolor agudo induce la liberación de glutamato de las terminales periféricas promoviendo la generación de corrientes post-sinápticas excitadoras (EPSCs) en las neuronas de segundo orden. La suma de las EPSCs resulta, en última instancia, en la generación de potenciales de acción y en la consecuente transmisión del mensaje doloroso a las neuronas de segundo orden (Basbaum et al., 2009). Además, el glutamato activa los receptores AMPA permitiendo la entrada de sodio y por lo tanto la despolarización de las neuronas post-sinápticas. Dicha despolarización remueve el ion magnesio que se encuentra bloqueando el poro del receptor NMDA. La activación de los receptores

ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) por parte del glutamato, junto con los receptores metabotrópicos (mGluR1/2/3/4/5/7/8) o el receptor de tirosina cinasa B (TrkB) permite la entrada de calcio y el inicio de múltiples cascadas de señalización que generan cambios en las corrientes iónicas, en las propiedades de los receptores y en la expresión de sus genes (**Fig. 8**) (Latremoliere y Woolf, 2010).

1.7.4 Sensibilización mediada por la interacción neurona-microglía

Bajo condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra distribuida de manera homogénea dentro de la materia gris de la médula espinal. Sin embargo, cuando existe un daño al tejido, la microglía presenta una variedad de transformaciones fenotípicas, así como la activación de distintas cascadas de señalización intracelular que dependen de la naturaleza e intensidad del estímulo (Erickson et al., 1992; Ransohoff y Perry, 2009).

El ATP liberado de la terminal central de las neuronas aferentes primarias activa a la microglía y astrocitos espinales (Suter et al., 2007). Además, las aferentes primarias liberan CSF-1 (Guan et al., 2016). La respuesta de la microglía a estas moléculas es sintetizar y secretar citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α y NGF, que activan a sus receptores localizados en las terminales post-sinápticas favoreciendo la hiperexcitabilidad neuronal (Sharif-Naeini y Basbaum, 2011) (**Fig. 8**). Otros moduladores liberados por la glía incluyen productos de la COX, ATP, óxido nítrico, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), D-serina y glutamato, los cuales aumentan la entrada de calcio a las neuronas de la médula espinal y estimulan la fosforilación de receptores y canales, incrementando su actividad y generando hipersensibilidad (Ji et al., 2013). Además, la microglía presenta una sobre-regulación de distintas proteínas específicas como la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba-1), el receptor tipo Toll 4 (TLR4) y el complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (MHCI y MHCII) (Tsuda et al., 2003).

Finalmente, la comunicación entre las neuronas y la microglía contribuye al desarrollo y establecimiento de la sensibilización central (Clark et al., 2013).

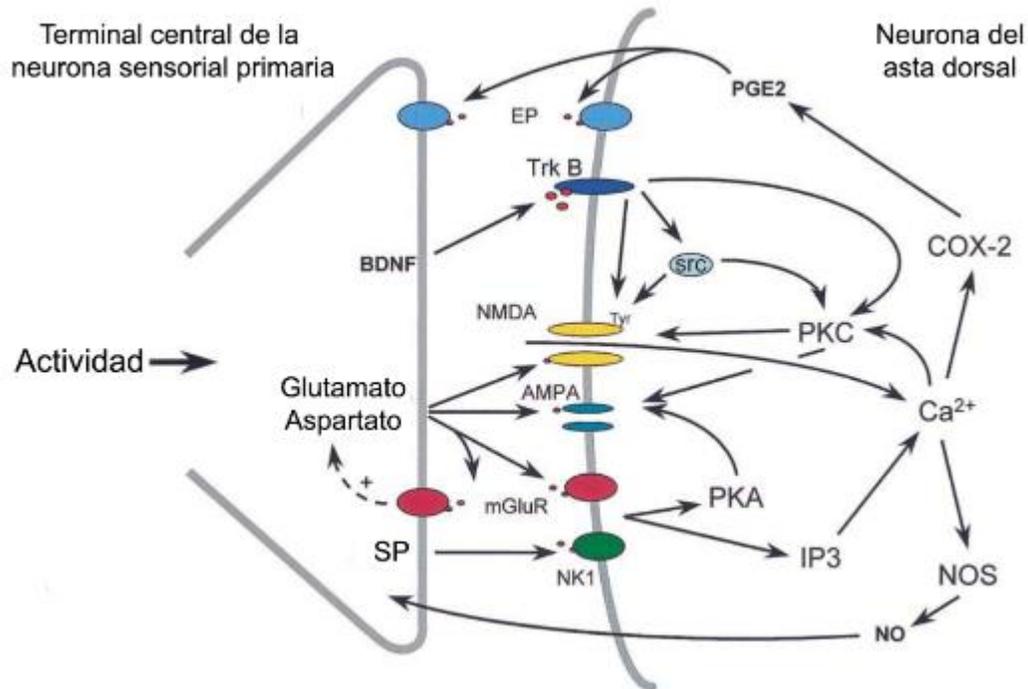


Fig. 8 Sensibilización central. La activación de las fibras C produce la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores, los cuales actúan sobre receptores metabotrópicos y tirosina-cinasa localizados en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. La activación de dichos receptores provoca la activación de cascadas de señalización intracelular que producen alteraciones en sus propiedades de activación. BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), PGE₂ (prostaglandina E₂), COX-2 (ciclooxigenasa 2), PKC (proteína cinasa C), Ca²⁺, NOS (óxido nítrico sintasa neuronal), NO (óxido nítrico), IP3 (fosfoinositol trifosfato), PKA (proteína cinasa A), NK1 (receptor a neuroquinina), mGluR (receptor metabotrópico a glutamato), SP (sustancia P), NMDA (receptor N-metil-D-aspartato), AMPA (receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), src (*proto-oncogene c-Src*), TrkB (cinasa B del receptor de tropomiosina) y EP (receptor a prostaglandina E₂). Tomado de Costigan y Woolf, 2000.

1.7.5 Sensibilización mediada por cambios en el sistema GABAérgico

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (Burt y Kamatchi, 1991). La actividad inhibitoria del GABA es fundamental en el procesamiento nociceptivo espinal (Miletic et al., 2003). En situaciones fisiológicas, las interneuronas GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal son importantes para la atenuación del dolor mediante un mecanismo denominado despolarización de la aferente primaria (Price et al., 2005; Vinay y Jean-Xavier, 2008). En la siguiente sección se abordará a detalle dicho proceso.

1.8 Inhibición y desinhibición espinal

El procesamiento de la información sensorial en el SNC depende de la transmisión sináptica inhibitoria (Zeilhofer et al., 2012). La importancia de la inhibición sináptica en el dolor se estableció con la “teoría del control de la compuerta” (Melzack y Wall, 1965). Dicha teoría plantea que la activación de las

neuronas de diámetro grande (fibras A β) disminuye la transmisión de impulsos en las neuronas de diámetro pequeño (fibras C) y, por lo tanto, disminuyen el dolor (Melzack y Wall, 1965; Price et al., 2009). La teoría sugiere que la información nociceptiva está bajo el control de mecanismos pre y post-sinápticos inhibitorios en la médula espinal (Chen et al., 2014).

La inhibición sináptica juega un papel importante en el procesamiento de la información nociceptiva (Prescott, 2015). Existen dos tipos de inhibición sináptica dentro del sistema nervioso central, una fásica y otra tónica (Farrant y Nusser, 2005). La primera tiene un papel importante en la transmisión de la información nociceptiva a centros superiores (Farrant y Nusser, 2005) y se debe principalmente a la activación de los receptores GABA y glicina localizados en la membrana post-sináptica. Dicha activación genera una corriente post-sináptica inhibitoria (IPSC) que produce una inhibición fásica en

las conexiones neurales (Ataka y Gu, 2006). Por su parte, la inhibición tónica ocurre cuando concentraciones bajas de GABA activan a los receptores GABA_A de alta afinidad localizados en sitios extrasinápticos y de esta manera producen una corriente inhibitoria tónica (Ataka y Gu, 2006; Farrant y Nusser, 2005; Semyanov et al., 2004). Tanto la inhibición fásica como tónica dependen de interneuronas inhibitorias locales y fibras descendentes que modulan la información sensorial antes de ser enviada hacia centros superiores y otras regiones de la médula espinal (Zeilhofer et al., 2012). La activación de los receptores GABA_A reduce la excitabilidad neuronal mediante dos mecanismos: hiperpolarizar la membrana post-sináptica y/o generar conductancias que provocan un corto circuito en la membrana pre-sináptica, lo cual reduce la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato (Bardoni et al., 2013). La actividad de los receptores GABA_A depende del gradiente de cloruro (Cl⁻) (Price et al., 2009). De esta manera, los receptores GABA_A localizados en las terminales periféricas modulan la entrada nociceptiva de las neuronas del GRD hacia las neuronas de proyección (inhibición pre-sináptica), mientras que los receptores GABA_A localizados en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal reducen la excitabilidad neuronal (inhibición post-sináptica) (Chen et al., 2014; Guo y Hu, 2014).

El bloqueo farmacológico de los receptores GABA_A reproduce las características del dolor crónico (alodinia mecánica, hiperalgesia y dolor espontáneo) (Price y Prescott, 2015; Zeilhofer et al., 2012). Existe evidencia que la inhibición sináptica GABAérgica disminuye bajo condiciones de dolor crónico (Coull et al., 2003; Keller et al., 2007) e inflamación persistente (Müller et al., 2003; Zeilhofer, 2008). Estos resultados sugieren que la pérdida de la inhibición sináptica ayuda a perpetuar el dolor (Coull et al., 2003; Keller et al., 2007; Prescott, 2015).

1.9 El cloruro en la regulación sináptica

El gradiente transmembranal de Cl^- en las neuronas se mantiene por co-transportadores que desempeñan diversas funciones fisiológicas como la modulación de las corrientes mediadas por los receptores GABA_A (Price et al., 2005, 2009). Los principales co-transportadores dentro del sistema nervioso son el co-transportador sodio-potasio-cloruro (NKCC1), que transporta Cl^- hacia el interior de la neurona, y el co-transportador potasio-cloruro (KCC2), que transporta Cl^- hacia el exterior de la neurona (Payne et al., 2003; Price et al., 2009). Estos co-transportadores desempeñan un papel importante en el dolor crónico y otros trastornos neurológicos (Price et al., 2009; Yousuf y Kerr, 2016).

1.9.1 Inhibición pre-sináptica: participación del co-transportador NKCC1 en la nocicepción

La inhibición pre-sináptica ocurre por la formación de conexiones axo-axónicas (Zeilhofer et al., 2012). Las neuronas sensoriales primarias tienen una expresión de co-transportadores distinta de las neuronas de segundo orden. Dichas neuronas solo tienen una expresión alta de NKCC1 y no tienen KCC2 (Álvarez-Leefmans et al., 2001; Price et al., 2009; Zeilhofer et al., 2012). Por tal motivo, la apertura del canal de Cl^- asociado al receptor GABA_A permite la salida de Cl^- de las neuronas y genera una despolarización sub-umbral, la cual provoca un corto circuito, que se conoce como despolarización de la aferente primaria (DAP) (Rocha-González et al. 2008; Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009). Esta despolarización se genera en las fibras aferentes que inervan músculo, mecanorreceptores cutáneos, fibras C y $A\delta$ y se considera que es el mecanismo que subyace a la inhibición pre-sináptica (Álvarez-Leefmans, 1988; Cervero et al., 2003; Price et al., 2009). Los mecanismos propuestos para explicar el fenómeno de la inhibición pre-sináptica producida por la DAP son: 1) la DAP inactiva canales de sodio dependientes de voltaje localizados en las terminales de las fibras aferentes primarias, interrumpiendo la propagación del potencial de acción proveniente de la periferia; 2) la DAP

atenúa la amplitud de los potenciales de acción a través del incremento en la conductancia de la membrana (*shunting*) debido a la apertura de canales de cloruro; lo anterior lleva a la disminución en la liberación de neurotransmisores en la terminal central de las aferentes primarias; y 3) la DAP inactiva canales de calcio dependientes de voltaje localizados en las terminales centrales, lo cual reduce la entrada de calcio a la pre-sinapsis lo que provoca una disminución en la liberación de neurotransmisores excitadores (Cervero et al., 2003; Price et al., 2005, 2009; Zeilhofer et al., 2012).

Bajo condiciones de daño al tejido, los estímulos provenientes de fibras no nociceptivas sensibilizadas estimulan de manera sostenida las interneuronas GABAérgicas espinales. Además, se sabe que la expresión y actividad de NKCC1 incrementa, lo cual provoca un aumento en las concentraciones intracelulares de Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$). En este sentido, el GABA liberado de las interneuronas activa a los receptores GABA_A pre-sinápticos de las neuronas sensibilizadas permitiendo una salida masiva de Cl^- . Esto genera una DAP excesiva que alcanza el umbral de disparo de potenciales de acción, conocidos como reflejos de la raíz dorsal (RRD) (Álvarez-Leefmans y Delpire, 2009; Cervero et al., 2003; Cervero y Laird, 1996; Loeza-Alcocer et al., 2013; Price et al., 2009). Los RRD se conducen de manera antidrómica a la terminal periférica de las fibras aferentes primarias donde inducen la liberación de SP y CGRP. Sin embargo, si los RRD se conducen de manera ortodrómica sobreexcitan a las neuronas de segundo orden que contribuye al desarrollo de la hipersensibilidad (Cervero et al., 2003; Cervero y Laird, 1996; García-Nicas et al., 2006; Loeza-Alcocer et al., 2013; Price et al., 2005).

Las primeras evidencias de la participación del co-transportador NKCC1 en el procesamiento de la información nociceptiva se obtuvieron en ratones *knock-out* de esta proteína. Dichos ratones presentaron un aumento en la latencia de retiro durante la prueba de la plancha caliente (*hot-plate*) (Sung et al., 2000) y sacudida de la cola (*tail-flick*) (Laird et al., 2004). Lo anterior sugería que el

NKCC1 desempeña un papel importante en la nocicepción térmica (Price et al., 2009). Estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica demostraron que el NKCC1 se expresa en neuronas de los GRD y neuronas del ganglio trigeminal (Álvarez-Leefmans et al., 2001; Price et al., 2006; Toyoda et al., 2005). Además, la aplicación de bumetanida o furosemida (inhibidores del NKCC1) sobre la piel inhibe las respuesta inducidas por la aplicación de histamina en humanos (Willis et al., 2004).

Se sabe que el NKCC1 está implicado en el dolor inflamatorio. En este sentido, la artritis aumentó el ARNm y la proteína del NKCC1 en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal de la rata. En contraste, se observó que durante la artritis crónica los niveles del ARNm y la proteína KCC2 retornaron a niveles basales, mientras que los niveles de la proteína NKCC1 permanecieron aumentados (Morales-Aza et al., 2004). Otro estudio reportó que la administración periférica local de bumetanida atenuó la fase 1 y 2 del modelo de formalina al 1%. Además, la administración intratecal de bumetanida también logró atenuar la fase 2 del modelo. El efecto espinal mencionado anteriormente, fue mimetizado por piretanida y furosemida (inhibidores de NKCC1). Estos datos sugieren que el NKCC1 se encuentra localizado en neuronas espinales y periféricas y que participa en la nocicepción inducida por formalina (Granados-Soto et al., 2005). Por su parte, la administración intracolónica de capsaicina en ratas incrementó la expresión del NKCC1 en la médula espinal. Además, la capsaicina indujo la fosforilación rápida del NKCC1 90 y 180 minutos después de la administración, sugiriendo que la fosforilación y el reclutamiento de NKCC1 tienen un papel importante en la hiperalgesia mecánica observada en este modelo (Galan y Cervero, 2005). De acuerdo con esto, la administración intratecal de bumetanida reduce la inflamación neurogénica y los RRD evocados por la estimulación mecánica y eléctrica después de la administración intradérmica de capsaicina (Valencia-de Ita et al., 2006). Asimismo la administración intracisternal de bumetanida

redujo la alodinia mecánica producida por la administración de IL-1 β (Kim et al., 2017).

Se ha reportado que la lesión de la médula espinal (SCI) de la rata aumentó la proteína NKCC1 en el epicentro de la lesión al día 14 post-SCI. Dicha lesión también disminuyó la proteína KCC2. En este sentido, la administración intraperitoneal de bumetanida redujo la hiperalgesia observada en el modelo (Ahmed et al., 2014; Cramer et al., 2008; Hasbargen et al., 2010). Del mismo modo, el daño a la médula espinal aumentó la proteína NKCC1 fosforilada en el GRD ipsilateral al daño. La administración de bumetanida redujo la hiperalgesia y previno la fosforilación del NKCC1 en el GRD (Mòdol et al., 2014). Se ha reportado que la ligadura del nervio trigeminal aumentó la expresión del ARNm y la proteína NKCC1 en neuronas de diámetro pequeño y grande (Wei et al., 2013). En contraste, la constricción crónica del nervio infraorbital no produjo cambios en la expresión del ARNm de NKCC1. Este hallazgo sugiere que la desregulación de la homeostasis del Cl⁻ no tiene un papel importante en el mantenimiento del dolor crónico inducido por la constricción del nervio infraorbital en el ratón (Castro et al., 2017).

El paclitaxel indujo cambios en la expresión de la proteína NKCC1 que se previnieron por bumetanida, efecto que no se observó con un agente estabilizador de actina. Lo anterior sugiere que el NKCC1 contribuye a la disminución de la inhibición sináptica espinal y al dolor neuropático inducido por paclitaxel (Chen et al., 2014).

En conjunto, los estudios mencionados sugieren que la alteración de la homeostasis del Cl⁻ debido a cambios en la expresión del co-transportador NKCC1 contribuye al desarrollo de la hiperalgesia tanto en modelos de dolor inflamatorio como neuropático. Los estudios en donde se ha evaluado la participación del co-transportador NKCC1 se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudios sobre la participación del co-transportador NKCC1 en el dolor.

| Modelo | Especie/ medición | Tratamiento | Localización/ expresión | Ref. |
|-----------------------------------|--|--|--|-------------------------------|
| Ratones KO | Ratones <i>KO</i> para NKCC1 Conducta | Los ratones <i>KO</i> para NKCC1 mostraron un incremento en la latencia de retiro de la pata | - | Sung et al., 2000 |
| Neuronas aisladas | Neuronas del GRD de rana, gato y rata Inmunohistoquímica y <i>Western blot</i> | - | La proteína NKCC1 se expresa en neuronas del GRD, células satelitales y de Schwann | Álvarez-Leefmans et al., 2001 |
| Ratones KO | Ratones <i>KO</i> para NKCC1 Conducta | Los ratones <i>KO</i> para NKCC1 mostraron un incremento en la latencia de retiro de la cola | - | Laird et al., 2004 |
| Artritis inducida con CFA | Ratas machos Hibridación <i>in situ</i> , inmunohistoquímica y <i>Western blot</i> | - | El ARNm del NKCC1 aumentó en los GRD y en el asta dorsal de la ME | Morales-Aza et al., 2004 |
| Dolor inflamatorio (Formalina 1%) | Ratas hembras Conducta | La administración local e i.t. de furosemida, bumetanida y piretanida (10-270 µg) inhibieron la fase 2 de la prueba. La furosemida i.t. inhibió ambas fases del modelo | - | Granados-Soto et al., 2005 |

| | | | | |
|---------------------------------|--|---|--|------------------------|
| Administración de capsaicina | Ratones <i>Western blot</i> y q-PCR | - | La proteína NKCC1 aumentó en la médula espinal 90 y 180 min después de la administración de capsaicina | Galan y Cervero 2005 |
| SCI | Ratas Conducta | La bumetanida (30 mg/kg, i.p.) aumentó el tiempo de retiro de la pata | La proteína NKCC1 aumentó 14 días post-SCI | Cramer et al., 2008 |
| CFA | Ratas machos <i>Western blot</i> | La administración aguda o crónica de SP, así como la co-administración de muscimol más SP aguda o crónica aumentó la proteína fosforilada NKCC1 | La proteína fosforilada NKCC1 aumentó en la RVM | Lagraize et al., 2010 |
| Inflamación pulpa con LPS | Ratones q-PCR | - | El ARNm del NKCC1 aumentó 1 día post administración de LPS en el Vc | Li et al., 2010 |
| SCI | Ratas <i>Western blot</i> | La administración de bumetanida (30 mg/kg, i.p.) disminuyó el dolor inducido por el SCI | La proteína NKCC1 aumentó en la médula espinal | Hasbargen et al., 2010 |
| Estrés por restricción de sueño | Conducta | La administración de bumetanida (30 y 90 ng) revirtió la hipersensibilidad mecánica | - | Wei et al., 2010 |

| | | | | |
|-----------------------------------|--|--|--|------------------------|
| CFA | Neuronas del GRD de ratas macho <i>Western blot</i> | - | La proteína fosforilada NKCC1 no aumentó en el GRD | Zhu et al., 2012 |
| CCI del nervio trigeminal | Ratas macho Inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> | - | El ARNm y la proteína NKCC1 aumentaron en neuronas de diámetro pequeño y grande en el GT | Wei et al., 2013 |
| Paclitaxel | Ratas machos q-PCR, y <i>Western blot</i> | La administración de bumetanida (2.5-20 ng) atenuó la hiperalgesia y alodinia inducidas por paclitaxel | La proteína NKCC1 aumentó, mientras que el ARNm disminuyó en la médula espinal | Chen et al., 2014 |
| SNI | Ratas hembras Conducta y <i>Western blot</i> | La administración de bumetanida (30 mg/kg) revirtió la hiperalgesia térmica y mecánica. Además, redujo la expresión de la proteína NKCC1 en el GRD | La proteína fosforilada NKCC1 aumentó en el GRD | Mòdol et al., 2014 |
| SCI | Ratas machos Conducta y <i>Western blot</i> | La administración de bumetanida aumentó la latencia de retiro de la pata | La proteína NKCC1 aumentó en el epicentro de la lesión en la ME post-SCI | Ahmed et al., 2014 |
| Estrés por administración de agua | Ratones hembras Inmunohistoquímica | - | La proteína NKCC1 aumentó en células granulares y piramidales del hipocampo de ratas | Tsukahara et al., 2015 |
| Estrés crónico impredecible | Ratas machos Inmunohistoquímica | La administración de bumetanida (20 μ M) disminuyó los niveles de CORT, así como el disparo de neuronas de ratas con estrés | La proteína NKCC1 aumentó en PVN 5 días post-estrés | Gao et al., 2016 |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---|---|---------------------|
| Encefalitis autoinmune | Ratones machos Conducta, <i>Western blot</i> y q-PCR | La administración de bumetanida (30 mg/kg) no revirtió la hipersensibilidad mecánica. Sin embargo, logró revertir a niveles basales la proteína NKCC1 | El ARNm y la proteína NKCC1 disminuyeron en la ME. El ARNm del NKCC1 no presenta cambios, mientras que la proteína NKCC1 aumentó en el GRD | Yousuf et al., 2017 |
| Dolor inflamatorio (IL-1 β) | Ratas machos Conducta | La administración de bumetanida (50 y 100 μ g) disminuyó la alodinia mecánica | - | Kim et al., 2017 |
| CCI del nervio infraorbital | Ratones hembras y machos Conducta y q-PCR | - | El ARNm del NKCC1 no presenta cambios 14 días post-CCI | Castro et al., 2017 |

CFA= adyuvante completo de Freund, SCI= *spinal cord injury*, LPS= lipopolisacárido, CCI= *chronic constriction injury*, SNI= *spared nerve injury*, ME= médula espinal, CORT = corticosterona

1.9.2 Inhibición post-sináptica: participación del co-transportador KCC2 en la nocicepción

Las neuronas del SNC maduro y principalmente las neuronas secundarias de la lámina I de la médula espinal tienen una $[Cl^-]_i$ menor a la extracelular (Price y Prescott, 2015). Por lo tanto, la activación del receptor $GABA_A$ permite la entrada de Cl^- a la neurona, lo que conduce a una hiperpolarización (inhibición de la excitabilidad). La baja concentración de Cl^- en las neuronas de segundo orden se debe a la presencia del co-transportador KCC2 y la ausencia del co-transportador NKCC1 (Price et al., 2009; Price y Prescott, 2015). Cuando el potencial de equilibrio del Cl^- está cerca del potencial de reposo de la membrana, la actividad de los receptores $GABA_A$ produce un corto circuito llamado *shunting*, el cual provoca una disminución en la excitabilidad neuronal (Doyon et al., 2011; Mark Farrant y Kaila, 2007; Prescott, 2015). En contraste, si el potencial de equilibrio del Cl^- es más positivo que el potencial de reposo de la membrana, la actividad de los receptores $GABA_A$ se vuelve despolarizante (Ben-ari, 2007; Doyon et al., 2011; Prescott et al., 2006).

Bajo condiciones normales, el KCC2 transporta Cl^- hacia el exterior de las neuronas y se encarga de mantener concentraciones bajas de Cl^- dentro del SNC (Ben-Ari, 2002). Por su parte, las neuronas inmaduras tienen una expresión baja del KCC2. Por tal motivo, durante el desarrollo el GABA tiene un papel excitador, lo cual es crucial para la formación de la sinapsis y la migración neuronal (Payne et al., 2003; Watanabe y Fukuda, 2015). Sin embargo, a partir de la tercer semana postnatal aumenta la expresión del KCC2 y las $[Cl^-]_i$ disminuyen lo cual contribuye a la función inhibitoria de los receptores $GABA_A$ (Ben-Ari, 2002; Watanabe y Fukuda, 2015). Después de una lesión al tejido nervioso, la expresión del KCC2 disminuye y el Cl^- se acumula (Kahle et al., 2008; Price y Prescott, 2015). En consecuencia, la apertura de los receptores $GABA_A$ resulta en la salida del Cl^- , lo que induce una despolarización en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Coull et al., 2003). Este cambio en la dirección del flujo de Cl^- reduce la

capacidad de inhibición de los receptores GABA_A (desinhibición) e incluso puede producir excitabilidad (Bonin y De Koninck, 2013; Price et al., 2009).

El primer estudio que demostró la relación entre el dolor neuropático y la disminución de la expresión del KCC2 se realizó en un modelo de daño a los nervios periféricos en ratas. Este estudio reportó una disminución de la proteína KCC2 en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral al daño (Coull et al., 2003). Subsecuentemente, otros estudios han reportado que el daño a los nervios periféricos también induce el mismo fenómeno (Huang et al., 2016; Kitayama et al., 2016; Mòdol et al., 2014; Wei et al., 2013). Además, el daño a los nervios periféricos redujo la proteína KCC2 fosforilada en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral al daño, así como en la corteza somatosensorial I y el núcleo ventral posterolateral del tálamo (Huang et al., 2016; Mòdol et al., 2014).

Por otra parte, la diabetes tipo I disminuyó la proteína KCC2 en neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Jolivalt et al., 2008). El dolor neuropático inducido por el daño a los nervios periféricos, el daño a la médula espinal producen la pérdida de la función de los sistemas inhibidores así como la disminución en la expresión del KCC2 en neuronas de la médula espinal (Kitayama, 2017). La pérdida de la función del KCC2 produce cambios en las $[Cl^-]_i$ en neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Dichos cambios modifican la función inhibidora del GABA en las neuronas espinales (Coull et al., 2003). Se ha reportado que el bloqueo farmacológico con DIOA, un antagonista del KCC2 (Huang et al., 2016), o el uso de un ARN de interferencia contra el KCC2 (siRNA) (Kitayama et al., 2016) disminuyeron los umbrales nociceptivos en animales intactos. Lo anterior confirma que la pérdida de la homeostasis del Cl^- es suficiente para inducir dolor (Price et al., 2005; Yousuf y Kerr, 2016).

La administración de lipolisacarido (LPS) en la superficie oclusal dental del ratón produce inflamación pulpar. Esta inflamación disminuyó el ARNm del KCC2 en el subnúcleo caudal del trigémino. En este sentido, la administración intracisternal de K252a, inhibidor de los receptores tirosina-cinasa, produjo un efecto antinociceptivo en dicho modelo. Esto sugiere que el KCC2 tiene un papel importante en la nocicepción y transmisión del dolor dental en el subnúcleo caudal (Hasbargen et al., 2010; Li et al., 2010). De la misma forma, el dolor incisional (inflamatorio) disminuyó la expresión de KCC2 en neuronas del asta dorsal de la médula espinal ipsilateral al daño (He et al., 2014). Además, la administración de formalina al 5% disminuyó la inmunorreactividad de KCC2 en la lámina II de la médula espinal ipsilateral al daño. Interesantemente, el pre-tratamiento con K252a revirtió dicho efecto, sugiriendo que el receptor TrkB participa en la disminución de la expresión del KCC2 (Tsuruga et al., 2016).

Por otra parte, la activación de la microglía en la médula espinal y la liberación de BDNF después de un daño al tejido tienen un papel importante en la reducción de la expresión del KCC2 (Bonin y De Koninck, 2013). Las fibras dañadas liberan ATP y CSF-1 desde las terminales centrales, estas activan a la microglía lo que provoca la liberación de BDNF en el asta dorsal de la médula espinal (Bonin y De Koninck, 2013; Guan et al., 2016; Zhang y De Koninck, 2006). El BDNF activa al receptor TrkB en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, desencadenando una vía de señalización que resulta en la disminución de la expresión del KCC2, la acumulación del Cl⁻ en el interior de la neurona y la pérdida de inhibición post-sináptica (**Fig. 9**) (Bonin y De Koninck, 2013; Coull et al., 2003; Hildebrand et al., 2016). Se sabe que la inflamación crónica también reduce la expresión del KCC2 a través del BDNF que se libera del tejido dañado (Kahle et al., 2008). Además, la producción de mediadores inflamatorios desempeña un papel importante en la desinhibición post-sináptica. En este sentido, la PGE₂ se une a su receptor EP₂ post-sináptico el cual activa a la PKA (Norberg et al., 2013), esta fosforila al

receptor de glicina provocando la inhibición de dicho receptor e impidiendo el control de la excitabilidad neuronal (Zeilhofer, 2008). Finalmente, la pérdida de la inhibición permite la fosforilación de los receptores NMDA aumentando su actividad lo cual aumenta la excitabilidad neuronal (Abe et al., 2005). En resumen, la desinhibición resulta en un incremento de la transmisión nociceptiva. Los estudios en donde se ha evaluado la participación del co-transportador KCC2 se resumen en la Tabla 2.

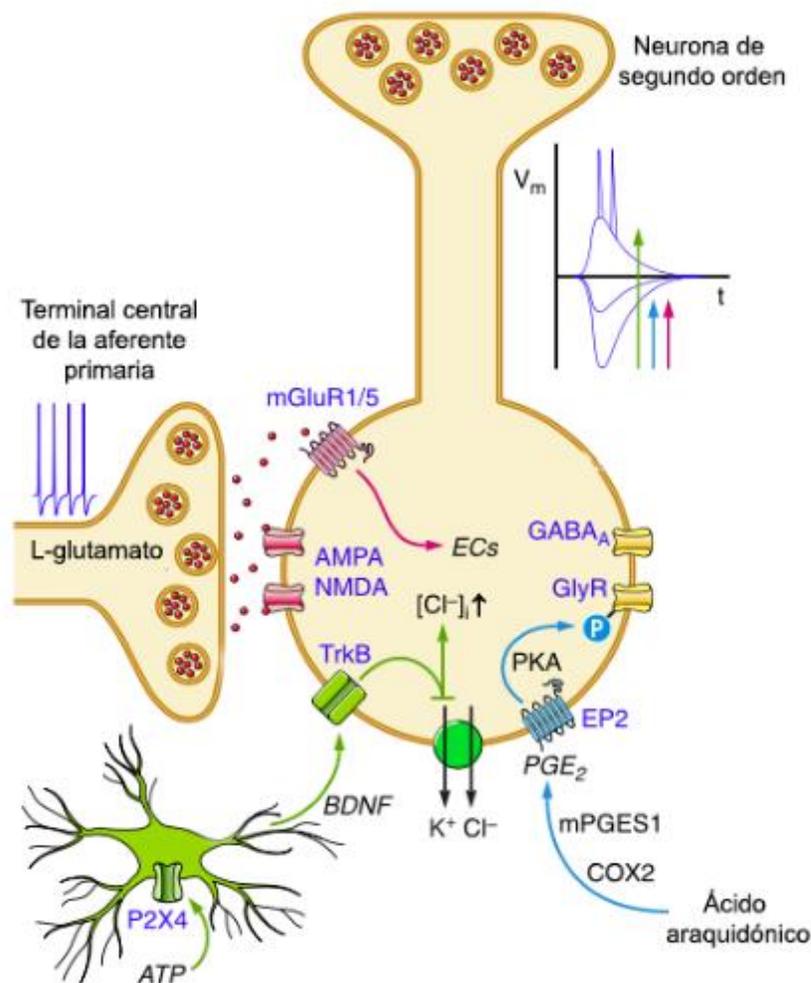


Fig. 9 Inhibición post-sináptica. Existen 3 vías involucradas en la reducción inhibitoria del asta dorsal de la médula espinal. Primero, el daño a los nervios periféricos y la activación de la microglía reducen el efecto inhibitor (línea verde). Segundo, la inflamación reduce la actividad de los receptores glicina, lo que contribuye a la pérdida de la función inhibitor (línea azul). Tercero, la liberación de endocannabinoides reduce la liberación de GABA y glicina, lo cual contribuye a la pérdida de la inhibición post-sináptica (línea rosa). Tomado de Zeilhofer et al., 2012.

Tabla 2. Estudios sobre la participación del co-transportador KCC2 en el dolor

| Modelo | Especie/medición | Tratamiento | Localización/ expresión | Ref. |
|---------------------------|---|--|--|--------------------------|
| Artritis con CFA | Ratas machos Hibridación <i>in situ</i> , inmunohistoquímica y <i>Western blot</i> | - | El ARNm y la proteína KCC2 aumentaron en el asta dorsal de la ME | Morales-Aza et al., 2004 |
| Neuronas aisladas | Neuronas del GRD Inmunocitoquímica | Las neuronas fueron estimuladas con NGF, ATP, bradicinina y PGE ₂ durante 1.3 h | Los mediadores inflamatorios disminuyeron la proteína KCC2, mientras que el ARNm de KCC2 no presentó cambios | Funk et al., 2008 |
| SCI | Ratas Conducta | La administración de bumetanida (30 mg/kg, i.p.) incrementó el tiempo de retiro de la pata | La proteína KCC2 disminuyó 14 días post-SCI | Cramer et al., 2008 |
| SCI | Ratas Conducta y <i>Western blot</i> | La administración de bumetanida (30mg/kg, i.p.) redujo el dolor inducido por SCI | La proteína KCC2 disminuyó en la ME | Hasbergen et al., 2010 |
| Inflamación pulpar (LPS) | Ratones q-PCR | - | El ARNm del KC2 disminuyó 1 día post administración de LPS | Li et al., 2010 |
| CCI del nervio trigeminal | Ratas machos Inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> | - | El ARNm y la proteína KCC2 disminuyeron en el núcleo trigeminal | Wei et al. 2013 |
| SNI | Ratas hembras Conducta, <i>Western blot</i> , inmunohistoquímica y | La administración de bumetanida (30 mg/kg) revirtió la hiperalgnesia térmica y mecánica. Además, redujo la expresión del KCC2 en la ME | La proteína fosforilada KCC2 disminuyó en la ME y corteza somatosensorial | Mòdol et al., 2014 |

| | | | | |
|--|---|---|---|---------------------------|
| Dolor incisional | Ratas machos Conducta e inmunohistoquímica | La administración de bumetanida (100 µg i.t.) disminuyó el score acumulativo y aumentó la latencia térmica y mecánica | La proteína KCC2 disminuyó en la ME | He et al., 2014 |
| Estrés por administración de agua | Ratones hembras Inmunohistoquímica | - | La proteína KCC2 disminuyó en células granulares y piramidales del hipocampo de ratas | Tsukahara et al., 2015 |
| Hiperalgnesia por retiro de nicotina | Ratas machos Conducta y <i>Western blot</i> | La administración de K252a aumentó la latencia de retiro de la pata | La proteína KCC2 disminuyó en la ME | Shi et al., 2015 |
| SCI | Ratas machos Conducta, <i>Western blot</i> y RT-PCR | La administración de bumetanida bloqueó el efecto del SCI | La proteína total y fosforilada KCC2 disminuyeron en la ME | Huang et al., 2016 |
| Estrés crónico impredecible | Ratas machos Inmunohistoquímica y electrofisiología | La administración de bumetanida (20 µM) disminuyó los niveles de CORT, así como el disparo de neuronas de ratas con estrés | La proteína KCC2 disminuyó en PVN 5 días post-estrés | Gao et al., 2016 |
| CCI del nervio infraorbital | Ratones hembras y machos Conducta y q-PCR | - | El ARNm del KCC2 no presentó cambios 14 días post-CCI | Castro et al., 2017 |
| Encefalitis autoinmune | Ratones machos Conducta, <i>Western blot</i> y q- PCR | La administración de bumetanida (30 mg/kg) no disminuyó la hipersensibilidad mecánica. Sin embargo, logró revertir a niveles basales la proteína NKCC1 | No hay cambios en el ARNm del KCC2, mientras que la proteína KCC2 disminuyó en la ME | Yousuf et al., 2017 |

CFA= adyuvante completo de Freund, SCI= *spinal cord injury*, LPS= lipopolisacárido, CCI= *chronic constriction injury*, SNI= *spared nerve injury*, ME= médula espinal, CORT = corticosterona, adm= administración

2. Antecedentes particulares

2.1 Fibromialgia

La fibromialgia es un síndrome de dolor músculo-esquelético generalizado que se caracteriza por la presencia de hipersensibilidad al tacto e hiperalgesia muscular, además de síntomas concomitantes mediados por el SNC tales como fatiga, depresión, dificultades cognitivas, trastornos del sueño y del estado de ánimo (Clauw, 2014; Sluka y Clauw, 2016). La fibromialgia es el segundo desorden reumatológico más común con una prevalencia del 2.7% a nivel mundial y aumenta considerablemente cada año (Marques et al., 2017; Queiroz, 2013). La fibromialgia afecta más a las mujeres que a los hombres en una proporción 2:1 y puede desarrollarse a cualquier edad, independientemente del grupo étnico (Clauw, 2014). Un estudio realizado en pacientes finlandeses, con un rango de edad de 10-12 años, reportó una prevalencia del 1.3% (Sherry et al., 1991). Sin embargo, Buskila et al reportaron una prevalencia del 6.2 % en pacientes israelíes con un rango de edad entre 9-15 años (Buskila et al., 1993; Macfarlane, 1999). El criterio de diagnóstico de la fibromialgia, publicado en 1990 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, *American College of Rheumatology*), era clínico y requería que los pacientes presentaran dolor crónico generalizado y sensibilidad en, al menos, 11 de 18 puntos sensibles determinados (Ablin et al., 2008; Wolfe et al., 1990). Dicho criterio se actualizó en 2010 e incluye una escala de severidad de síntomas y un índice de dolor generalizado, lo que permite una aproximación alternativa al diagnóstico de la enfermedad (Clauw, 2014; Wolfe et al., 2011).

2.2 Patogénesis de la fibromialgia

Al igual que en otros síndromes de dolor funcional, la etiología de la fibromialgia no se conoce. Los mecanismos propuestos incluyen: 1) desregulación del sistema nervioso periférico, central y autónomo que promueve la amplificación en la transmisión nociceptiva y su interpretación a

nivel cortical; 2) disfunción neuroendocrina en respuesta al estrés mediado por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal; 3) alteración en las funciones del sistema inmune; 4) disfunción del metabolismo muscular producido por alteraciones del estrés oxidativo a nivel mitocondrial; y 5) factores genéticos (Covarrubias-Gómez y Carrillo-Torres, 2016; Sluka y Clauw, 2016).

La presencia de síntomas concomitantes como fatiga, dificultades en la memoria, depresión, trastornos del sueño y del estado de ánimo apoya la idea que el problema de la fibromialgia subyace a nivel central (Clauw, 2014). La característica principal de la fibromialgia es un desbalance en los niveles de los neurotransmisores. Las concentraciones de serotonina, noradrenalina y dopamina se encuentran disminuidas en el fluido cerebroespinal y en el suero de pacientes con fibromialgia (Russell et al., 1992). Además, se ha reportado que los pacientes con fibromialgia presentan un aumento en los niveles de opioides en el fluido cerebroespinal y una disminución en la disponibilidad de los receptores a opioides a nivel central (Baraniuk et al., 2004; Harris et al., 2007); lo anterior puede provocar una alteración en la modulación descendente del dolor (Sluka y Clauw, 2016).

Por otra parte, los pacientes con fibromialgia muestran un aumento en los niveles de glutamato en áreas cerebrales relacionadas en el procesamiento del dolor, como la ínsula y la corteza cingular posterior (Harris, 2010; Harris et al., 2009; Larson et al., 2000; Sarchielli et al., 2007). De la misma manera, se ha reportado que pacientes con fibromialgia tienen altas concentraciones de SP comparadas con pacientes sanos (Russell et al., 1994; Schwarz et al., 1999). En resumen, lo anterior sugiere que un aumento de los neurotransmisores excitadores contribuye al mantenimiento de la sensibilización central (Sluka y Clauw, 2016).

Por otra parte, la amplificación de los estímulos sensoriales es un fenómeno relevante en la fibromialgia y ocurre como consecuencia de alteraciones en la

modulación descendente. Diversos estudios de neuroimagen funcional reportan una activación irregular de la PAG que se relaciona con el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización central (Truini et al., 2016). Además, los pacientes con fibromialgia muestran patrones de activación cerebral que indican que experimentan dolor ante una presión ligera o un estímulo térmico leve, percibidos como inocuos en pacientes sanos. Las regiones que presentan mayor activación son la ínsula posterior, la corteza somatosensorial 1 y 2, el putamen, el tálamo, la amígdala, la corteza cingular posterior y el cerebelo (Cook et al., 2004; Gracely et al., 2002; López-Solà et al., 2017). Además, los pacientes con fibromialgia tienen una baja tolerancia al calor, al frío, a estímulos eléctricos e incluso a estímulos sensoriales como el sonido (Geisser et al., 2008; Petzke et al., 2003).

La alteración de la información nociceptiva en el sistema nervioso periférico (SNP) tiene un papel importante (Clauw et al., 2011). Se ha observado una reducción en el número de fibras nerviosas de la epidermis de pacientes con fibromialgia en comparación con pacientes sanos (Caro y Winter, 2014; Doppler et al., 2015; Oaklander et al., 2013; Üçeyler et al., 2013). Se especula que la inflamación crónica es una causa de fibromialgia. En este sentido, se ha reportado un incremento en la liberación de citocinas proinflamatorias a nivel periférico en pacientes con fibromialgia (Mendieta et al., 2016) tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Salemi et al., 2003; Wallace et al., 2001; Wang et al., 2008). La IL-8 (Kosek et al., 2015; Wallace et al., 2001), el óxido nítrico (Larson et al., 2000) y la proteína HMGB1 (Oktayoglu et al., 2013) aumentan en la circulación sistémica y en el fluido cerebroespinal de pacientes con fibromialgia. La proteína HMGB1 es crucial en la respuesta al estrés oxidativo, debido a que su unión con el receptor TLR4 modula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, se sugiere un desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes en pacientes con fibromialgia, lo cual puede causar daño isquémico a nivel periférico (Akkuş et al., 2009). Además, se ha reportado que pacientes con fibromialgia muestran un daño

oxidativo severo en el tejido muscular, que incluye la fragmentación del ADN, alteraciones en la expresión de enzimas constitutivas y cambios en el número y tamaño de las mitocondrias (Sprott et al., 2004). También, se reportó un aumento en la peroxidación de los lípidos debido a la acción de las ROS (Akkuş et al., 2009). Se sabe que las ROS activan al inflammasoma NLRP3, el cual promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias y de ROS (Cordero et al., 2014).

Se ha reportado una relación entre la fibromialgia y el estrés crónico; lo anterior ha involucrado el estudio del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y del sistema nervioso simpático. El eje HPA en pacientes con fibromialgia presenta una respuesta limitada al cortisol, a la hormona del crecimiento y a la prolactina, así como un incremento en la actividad de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona folículo estimulante (Geenen et al., 2002; Rao et al., 2007). Los pacientes con fibromialgia muestran una disminución en la cantidad de estrógenos, hormona del crecimiento y hormona triyodotironina (Geenen et al., 2002; Jones et al., 2007; Neeck, 2000), mientras que los niveles plasmáticos de cortisol se encuentran elevados (Geenen et al., 2002). En este sentido, se ha reportado que el sistema serotoninérgico tiene gran influencia sobre el eje HPA, por tal motivo algunas anormalidades del sistema endocrino podrían estar relacionadas con la disminución de 5-HT en los pacientes con fibromialgia (Neeck, 2000).

Se ha propuesto que la fibromialgia es una enfermedad hereditaria. Por lo tanto, se ha evaluado la participación de factores y antecedentes genéticos en el desarrollo de este padecimiento. Los genes que se han propuesto como biomarcadores para la fibromialgia tienen relación con alteraciones en la transmisión y el procesamiento del dolor. Entre ellos destacan la enzima que degrada las catecolaminas *COMT* (catecol-O-metiltransferasa), los genes que codifican para el *ADRB2* (receptor adrenérgico β_2), el *HTR2A* (receptor 5-HT_{2A}), el *SLC6A4* (transportador de 5-HT dependiente de Na), el *CNR1*

(receptor cannabinoide tipo 1), el *GRIA4* (subunidad 4 del receptor AMPA) y el *GCH1* (ciclohidrolasa guanosa-trifosfato) (Ablin y Buskila, 2015). Un estudio reportó que el ADN de pacientes con fibromialgia presenta un patrón de hipometilación en genes implicados en la respuesta al estrés, en la reparación del ADN y en la eliminación de las ROS. Lo anterior sugiere que el desarrollo de la fibromialgia podría estar relacionado con mecanismos epigenéticos (Ciampi de Andrade et al., 2017).

2.2.1 Tratamiento de la fibromialgia

A pesar de la relevancia epidemiológica de la fibromialgia, no existen tratamientos totalmente útiles y satisfactorios. Los tratamientos actuales tienen como objetivo reducir el dolor, pero también restaurar la salud emocional y mental para mejorar la calidad de vida de las personas con fibromialgia.

La terapia farmacológica para la fibromialgia tiene como objetivos principales 1) reducir la liberación de neurotransmisores excitadores y 2) incrementar la liberación de neurotransmisores inhibidores. Entre los fármacos más utilizados para el tratamiento de la fibromialgia se encuentran los antidepresivos tricíclicos, los gabapentinoides y los inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina (**Tabla 3**). De los fármacos mencionados, la pregabalina, la duloxetina y el minalcipran están aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Clauw, 2014). Se ha reportado que, la administración de gabapentina reduce los niveles de glutamato en la ínsula posterior de pacientes con fibromialgia (Harris, 2010; Harris et al., 2013). Además, la duloxetina disminuye el dolor y los síntomas relacionados con la fibromialgia. También la administración de ketamina (antagonista NMDA) redujo el dolor en pacientes con fibromialgia (Graven-Nielsen et al., 2000). A pesar de que los fármacos mencionados disminuyen el dolor entre el 30-50%, no suelen ser eficaces en todos los pacientes y producen efectos secundarios que ocasionan el abandono del tratamiento (Clauw, 2014).

Los opioides no son eficaces para el tratamiento de la fibromialgia. Esta falta de efectividad probablemente se debe, a las alteraciones en el sistema opioidérgico que presentan algunos pacientes con fibromialgia (Harris et al., 2007). Sin embargo, un estudio reportó que el 57% de los pacientes que recibieron dosis bajas del antagonista naltrexona (3-4.5 mg) presentaron una reducción del dolor (Younger et al., 2013). Además, el tramadol, que es un antagonista opioide presenta cierta eficacia en pacientes con fibromialgia. Sin embargo, este efecto se debe, posiblemente, a su actividad como inhibidor de la recaptura de 5-HT y noradrenalina (Russell, 2000). En contraste, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticosteroides no disminuyen el dolor de los pacientes con fibromialgia (Clauw, 2014). Se ha reportado que la combinación de acetaminofén y tramadol, a pesar de que su eficacia *per se* no se ha demostrado por completo, es efectiva en pacientes con fibromialgia (Bennett et al., 2005). Además, los relajantes musculares, como la ciclobenzaprina, muestran eficacia en pacientes con fibromialgia. Sin embargo, el 85% de los pacientes desarrollan efectos secundarios (Tofferi et al., 2004). Asimismo, el uso de agonistas cannabinoides, como la nabilona, disminuye el dolor y la rigidez en pacientes con fibromialgia (Fiz et al., 2011). Finalmente, se ha reportado que las benzodiacepinas muestran una eficacia contra el insomnio y trastornos de ansiedad presentes en pacientes con fibromialgia (Corrigan et al., 2012).

Además del tratamiento farmacológico, la búsqueda del alivio de los síntomas de la fibromialgia incluye tratamientos alternativos no farmacológicos, entre los que destacan las terapias cognitivas, conductuales y la acupuntura. Estas terapias han mostrado efectividad en la reducción del dolor, fatiga, insomnio y manejo del estrés (Williams y Clauw, 2009). También el ejercicio aeróbico y la hidroterapia tienen efectos benéficos a través de la activación de los sistemas analgésicos endógenos (Abeles et al., 2008; Williams y Clauw, 2009). Finalmente, los suplementos nutricionales, como la coenzima Q₁₀ (Cordero et al., 2012) y la L-carnitina (Rossini et al., 2007), han mostrado efectos benéficos

en pacientes con fibromialgia. Las dietas bajas en glutamato también mejoran los síntomas relacionados con la fibromialgia (Holton et al., 2012).

Tabla 3. Tratamiento farmacológico de la fibromialgia

| Tipo | Fármacos | Dosis | Efectos adversos |
|--|-----------------|---|--|
| Antidepresivos tricíclicos | Amitriptilina | 10-70 mg/día | Boca seca, ganancia de peso, constipación, sensación de estar "sedado" |
| | Ciclobenzaprina | 5-20 mg/día | |
| Inhibidores de la recaptura de 5-HT y NA | Duloxetina | 30-120 mg/día | Náusea, palpitaciones, dolor de cabeza, fatiga, taquicardia e hipertensión |
| | Minalcipran | 100-200 mg/día | |
| Gabapentinoides | Gabapentina | 800-2400 mg/día | Sedación, ganancia de peso, mareo |
| | Pregabalina | 600 mg/día en dosis divididas | |
| γ -hidroxibutirato * | | 4.5-6 mg por noche en dosis divididas | Sedación, depresión respiratoria |
| Inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT | Fluoxetina | | Náusea, disfunción sexual, ganancia de peso, problemas de sueño |
| | Sertralina | | |
| | Paroxetina | | |
| Cannabionoides ** | Nabilona | 0.5 g antes de dormir o 1 mg dos veces al día | Sedación, mareo, boca seca |
| Opioides *** | Naltrexona | 4.5 mg/día | |
| | Tramadol | Con o sin acetaminofén, 50-100 g cada 6 h | Sedación, adicción, tolerancia, hiperalgesia |

*Eficacia demostrada. No aprobado por la FDA debido a asuntos de seguridad. ** Ningún cannabinoide sintético ha sido aprobado para el tratamiento del dolor. ***Los opioides son poco efectivos para tratar el dolor crónico. No hay evidencia de eficacia con opioides más fuertes. Serotonina (5-HT), Noradrenalina (NA). Modificado de Clauw, 2014.

2.3 Modelos animales para el estudio de la fibromialgia

Los modelos animales son herramientas que contribuyen al desarrollo de nuevos tratamientos y a investigar mecanismos involucrados en ciertas patologías (DeSantana et al., 2013). En el caso de la fibromialgia, no se ha

establecido un modelo animal que mimetice todas las características de dicho padecimiento debido a su etiología incierta (Nagakura y Takahashi et al., 2012; Sluka, 2009). Los modelos utilizados para estudiar los mecanismos del dolor crónico generalizado y la fibromialgia se clasifican en tres grupos: 1) modelos de exposición a estresores; 2) modelos que requieren la administración de un compuesto; y 3) modelos que combinan ambos aspectos (DeSantana et al., 2013; Nagakura y Takahashi et al., 2012; Taguchi et al., 2015). Todos los modelos tienen en común la presencia de dolor crónico que se extiende tanto ipsi como contralateral y para el cual no existe algún trastorno orgánico que pueda explicar su presencia. Los cambios en el SNC y SNP, así como la respuesta al tratamiento farmacológico varían para cada modelo (DeSantana et al., 2013).

2.3.1 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

Nagakura et al. en 2009 proponen un nuevo modelo para el estudio de la fibromialgia. La administración subcutánea de reserpina (1 mg/kg) durante 3 días consecutivos en ratas hembras y machos reduce de manera significativa los umbrales de presión muscular, así como los umbrales de retiro de la pata por más de una semana lo que resulta en hiperalgesia muscular y alodinia táctil, respectivamente (Nagakura et al., 2009; Nagakura y Takahashi et al., 2012). Se cree que la sensibilidad en el modelo es consecuencia de la depleción de aminas biogénicas a nivel del SNC (DeSantana et al., 2013; Nagakura et al., 2009; Taguchi et al., 2015). La reserpina reduce la concentración de dopamina, 5-HT y noradrenalina en la médula espinal, el tálamo y la corteza prefrontal de las ratas, lo que se relaciona con la reducción de los umbrales de retiro de la pata y presión muscular (Nagakura et al., 2009; Nagakura y Takahashi et al., 2012; Oe et al., 2010).

Por otra parte, la ratas tratadas con reserpina no muestran alteraciones en la presión arterial, en la temperatura o cambios histopatológicos relevantes en el

SNC (Nagakura y Takahashi et al., 2012; Oe et al., 2010). Por tal motivo, el modelo logra mimetizar la hiperalgesia observada durante la fibromialgia sin producir daño a los tejidos o inflamación.

Varios estudios demuestran que la hiperalgesia en dicho modelo disminuyó con la administración de pregabalina, duloxetina, pramipexol, tramadol y agonistas del receptor 5HT_{2C}, pero no con diclofenaco u otros AINEs (Kaneko et al., 2014; Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013). Además, la pregabalina fue eficaz en ratones reserpinizados. En este sentido, la administración de la toxina Ph α 1 β , un bloqueador de los canales de calcio, también redujo la hiperalgesia mecánica y térmica en ratones (de Souza et al., 2014). Estudios de neuroimagen funcional en ratas mostraron patrones de activación cerebral diferentes con respecto al grupo control, cuando se evaluó la respuesta a estímulos moderados (Wells et al., 2017). Lo anterior es comparable con los patrones de activación cerebral observados en pacientes con fibromialgia (López-Solà et al., 2017).

Taguchi et al. en 2015 propusieron que la hiperalgesia observada en ratas reserpinizadas está regulada por mecanismos periféricos y centrales. Dicho estudio mostró una alteración en la función de los nociceptores sensibles a estímulos mecánicos. Lo anterior sugiere una entrada de estímulos inocuos a vías nociceptivas que contribuyen a la disfunción en la modulación nociceptiva. También se reportó que la reserpina aumentó la expresión de los canales sensibles a ácido 3 (ASIC3) en el GRD. Sin embargo, no se reportaron cambios en la expresión de otros receptores como los Piezo, TRPVs, canales de sodio dependientes de voltaje u otros ASIC. Además, el bloqueo de los canales ASIC3 redujo la hipersensibilidad mecánica en dicho modelo. Igualmente, la administración de reserpina indujo la activación de la microglía en el asta dorsal de la médula espinal. En este sentido, el tratamiento con minociclina, un inhibidor de la microglía y astrocitos, redujo y previno el desarrollo de hiperalgesia mecánica, lo cual sugiere que la sensibilización

central podría estar contribuyendo a la hipersensibilidad presente en ratas tratadas con reserpina (Taguchi et al., 2015).

Se ha reportado que la reserpina aumenta los niveles de caspasa-3 y la expresión de la subunidad GluN2B de los receptores NMDA en la amígdala de ratones (Liu et al., 2014). Hay evidencia que la reserpina aumenta los niveles de glutamato en el tálamo (Klein et al., 2014) y de las ROS en el líquido cefalorraquídeo de ratones (Peres Klein et al., 2016). Además, la reserpina aumenta los niveles de SP, ROS, citocinas pro-inflamatorias, NF- κ B y caspasa-3 en la corteza e hipocampo de ratas (Arora y Chopra, 2013). Igualmente, la reserpina induce cambios en la estructura de las fibras del músculo gastrocnemio así como una disminución en la expresión de enzimas antioxidantes, lo cual podría ser indicativo de daño oxidativo muscular que se previene tras la administración de melatonina (Favero et al., 2017).

El modelo de fibromialgia inducido por reserpina también desarrolla conductas tipo depresión, las cuales se han determinado por un incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (Nagakura et al., 2009) y por la prueba de supresión del alimento (Blasco-Serra et al., 2015). Se ha reportado que el tratamiento con curcumina, colorante natural proveniente de la cúrcuma, reduce las conductas tipo depresivas en ratas tratadas con reserpina (Arora et al., 2011). Debido a la similitud de los síntomas y características del modelo de fibromialgia inducido por la reserpina con la fisiopatología de dicho padecimiento en humanos lo anterior nos permite sustentar la elección del modelo.

2.4 Participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 en el dolor funcional

A la fecha, existen algunos trabajos que han evaluado la participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 en diferentes modelos de dolor funcional (Gao et al., 2016; Tang et al., 2015; Tsukahara et al., 2015; Wei et al., 2010).

El primer estudio que demostró la pérdida de la homeostasis del Cl^- como un mecanismo importante en el dolor funcional se realizó en un modelo de restricción del sueño (48 horas) en ratas. Se observó que la restricción de sueño produce hipersensibilidad mecánica que se revierte por la administración de bumetanida (Wei et al., 2010). Además, se ha reportado que la hipersensibilidad visceral disminuyó la proteína KCC2 en el asta dorsal de la médula espinal de ratas (Tang et al., 2015).

Por otra parte, el estrés por administración de agua aumentó la proteína NKCC1 y disminuyó la proteína KCC2 en células granulares y piramidales de la región del giro dentado, CA1 y CA3 del hipocampo de ratas (Tsukahara et al., 2015). También, se reportó que el estrés crónico aumentó la proteína NKCC1 10 días post-estrés. En contraste, el estrés disminuyó la proteína KCC2 en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo de la rata, que retornó a valores basales 5 días después de la última exposición al estrés. En este sentido, la administración de bumetanida revirtió el efecto inducido por la gabazina (antagonista de los receptores GABA_A) en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas con estrés (Gao et al., 2016).

En resumen, los estudios mencionados sugieren que la pérdida de la homeostasis del Cl^- debido a cambios en la expresión de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 podría contribuir a la hipersensibilidad observada en distintos modelos de dolor funcional.

3. Justificación

La fibromialgia afecta a un número grande y creciente de personas en todo el mundo. Actualmente el tratamiento farmacológico para la fibromialgia es inefectivo. Se sabe que el dolor crónico afecta los sistemas de inhibición espinal disminuyendo su capacidad de inhibir el dolor. Los co-transportadores de Cl⁻ se han propuesto que participan en dicho fenómeno. Particularmente los co-transportadores NKCC1 y KCC2 tienen un papel importante en la modulación de las conductas nociceptivas en modelos crónicos de dolor inflamatorio y neuropático. Sin embargo, se desconoce si dichos co-transportadores están involucrados en el mantenimiento de la alodinia táctil e hiperalgesia muscular en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. El demostrar la participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 podría representar una alternativa terapéutica para el tratamiento de la fibromialgia y otros síndromes de dolor funcional relacionados.

4. Hipótesis

El aumento en la actividad de NKCC1 en las neuronas aferentes primarias y la disminución en la actividad de KCC2 en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal contribuyen a la hipersensibilidad observada en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina en ratas.

5. Objetivo general

Determinar la participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina en ratas.

6. Objetivos particulares

- ✓ Estandarizar la alodinia táctil e hiperalgesia muscular en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina.
 - ✓ Caracterizar la fatiga muscular en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina.
- ✓ Determinar farmacológicamente la participación de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina.
- ✓ Determinar la expresión de las proteínas NKCC1 y KCC2 en los ganglios de la raíz dorsal y médula espinal en el modelo de fibromialgia por la administración de reserpina.

7. Materiales y métodos

7.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos con un peso corporal de 200-220 g. Todos los animales fueron proporcionados y mantenidos en el bioterio del Cinvestav (Unidad Coapa) bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas y ciclos de luz-oscuridad 12:12 horas, con libre acceso a agua y alimento. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Además, el protocolo fue aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Protocolo No. 0042-13). Cada rata se utilizó sólo una vez y se sacrificó en una cámara con CO₂ al final de cada experimento.

7.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

El dolor se indujo de acuerdo con el procedimiento descrito por Nagakura et al. en 2009. En breve, los animales recibieron una administración subcutánea de reserpina (1 mg/kg) una vez al día durante tres días consecutivos.

7.3 Evaluación de la alodinia táctil

Las ratas se colocaron de forma individual en cajas de acrílico transparente sobre una malla metálica durante 20 min para habituarse. Los animales se estimularon en la parte media de la pata posterior con filamentos de von Frey (Stoeling Co., Wood Dale, IL, EUA). El 50% de umbral de retiro se determinó empleando el método de “*up-down*” (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1980). La prueba consistió en estimular durante 5-8 segundos la parte media de la superficie plantar. Se consideró como respuesta positiva la conducta de retiro de la pata y se marcó con “X”, mientras que una respuesta negativa consistió en no retirar la pata y se señaló con “0”. A partir del primer cambio en la respuesta, se realizaron 4 evaluaciones adicionales para obtener seis

mediciones registradas. Con estos valores y el valor del último filamento utilizado se calculó el 50% de umbral de retiro empleando la siguiente fórmula:

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

Donde X_f es el valor del último filamento de von Frey utilizado (unidades logarítmicas); k es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado con base al número de respuestas positivas y negativas; y δ se refiere a las diferencias de promedio entre estímulos (unidades logarítmicas).

7.4 Evaluación del umbral de presión muscular

El umbral de presión muscular se midió de acuerdo con el método reportado por Schäfers et al. en 2003. Las ratas se envolvieron en un paño de franela y cada extremidad posterior se posicionó para aplicar una fuerza mecánica que incrementaba linealmente (máximo 250 g) sobre el músculo gastrocnemio. La respuesta se midió como la presión en gramos necesaria para que la rata retirara la extremidad o vocalizara. Cada prueba se repitió tres veces con intervalos de 1 min entre cada estímulo. El promedio del umbral de presión muscular se calculó con base en tres mediciones realizadas.

7.5 Evaluación de la fatiga muscular

La fatiga muscular se midió con la prueba de campo abierto para la cual se utilizó un actímetro de sensor infrarrojo (Panlab, modelo LE8825, Barcelona, España) con una cámara de grabación acoplada, el cual registró los movimientos realizados por el animal. Previamente, los animales fueron ejercitados 30 o 60 minutos en el Rota-rod. Posteriormente, los animales se colocaron en el centro del actímetro por 5 minutos y se les permitió deambular libremente. Los parámetros (distancia recorrida y porcentaje de actividad)

fueron analizados mediante el programa VIEWER (BIOSERVE Behavioral research, Bonn, Alemania).

7.6 Fármacos

La bumetanida (ácido 3-butilamino-4-fenoxi-5-sulfamoil-benzoico) y furosemida (5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil)amino] ácido benzoico) (Cat. B3032 y Cat. F4381, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), inhibidores de NKCC1, se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO, Cat. D8418, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) al 100% para su administración intratecal en un volumen de 10 μ l en tres dosis diferentes (10, 50 y 100 μ g; 10, 50, 100 y 300 μ g, respectivamente). El CLP 257 ((5Z)-5[(4-fluoro-2-hidroxifenil) metileno]-2-(tetrahydro-1-(2H)-piridazinil)-4(5H)-tiazolona) (Cat. 5242, Tocris, Bioscience, Elisville, MO), activador del KCC2, se disolvió en DMSO al 100% para su administración intratecal en un volumen de 10 μ l en cuatro dosis diferentes (50, 100, 200 y 300 μ g). La reserpina (Cat. R0875, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se disolvió en ácido acético glacial (Cat. 320099, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se diluyó a una concentración final de 0.5% de ácido acético en solución salina al 0.9%.

La elección de las dosis de bumetanida y furosemida se basó en estudios previos (Granados-Soto et al., 2005). La elección de las dosis del CLP 257 se basó en experimentos piloto realizados en nuestro laboratorio.

7.7 Determinación de la expresión de los co-transportadores NKCC1 y KCC2

7.7.1 Obtención de tejidos

Los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los GRD (L4-L6) y la parte lumbar de la médula espinal (L1-S1) en su porción dorsal. Inmediatamente, el tejido se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó en tubos de centrifugación a -70 °C hasta su uso. Las muestras se homogenizaron con 400 μ l de amortiguador RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM,

Tritón 100 X 0.1% y SDS 0.1%) que contenía una serie de inhibidores de proteasas (aprotinina 6.8 µg/ml, leupeptina 4 µg/ml, peptidasa A 4 µg/ml, SBTI 4 µg/ml PMSF 2 mM y NaVO₄ 2 mM). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se recolectó y se almacenó a -70 °C hasta la cuantificación de las proteínas totales.

7.7.2 Western blot

La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron volúmenes equivalentes a 50 µg de proteína total y se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida de dos dimensiones al 10% para el caso de NKCC1 o al 6% para el caso de KCC2. Las proteínas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon a 4 °C durante toda la noche con leche descremada al 5%. Posteriormente, se incubaron por 24 horas a 4 °C con el anticuerpo primario dirigido contra NKCC1 (mouse anti-NKCC1, Cat. T4, 1:1000, Development Studies, Hybridoma Bank, IA) o contra KCC2 (rabbit anti-KCC2, Cat. 07-432, 1:12000, Millipore, MA). Para la inmunodetección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (anti-mouse, Cat. GTX213111-01, 1:5000, GeneTex Inc., CA, EUA o anti-rabbit, Cat. 11-035-033, 1:6000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA). Finalmente, mediante quimioluminiscencia (Western Lightning® Plus-ECL, MA) se obtuvo una imagen fotográfica (ChemiDoc™ XRS+ *ImagingSystem*, Bio-Rad, CA) y posteriormente se realizó un análisis densitométrico de las bandas (ImagenLab™ versión 5.0, Bio-Rad, CA). Después de la detección del NKCC1 y KCC2, las membranas nuevamente se bloquearon e incubaron con el anticuerpo contra β-actina (mouse anti-Actina, Cat. SAB2100878, 1:10000, GeneTex Inc., CA, EUA) y su respectivo anticuerpo secundario (anti-mouse, Cat. GTX213111-01, 1:5000, GeneTex

Inc., CA). La expresión de la actina se usó como control de carga para normalizar los niveles de la expresión de ambas proteínas de interés.

7.8 Análisis de datos y estadística

Los resultados conductuales se expresan como la media \pm el error estándar (EE) de seis animales por grupo. El umbral de retiro y el umbral de presión muscular se graficaron en función del tiempo. Posteriormente se determinó el área bajo la curva (ABC) de cada curso temporal mediante el método de los trapezoides y se graficó la media \pm EE de cada grupo.

Los resultados del *western blot* se presentan como la media \pm EE de cuatro animales por grupo graficando el porcentaje de intensidad relativa de las bandas con respecto a su control de carga.

Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía o dos vías seguido por la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas entre dos grupos se obtuvieron mediante la prueba de t de *Student*. Para todos los casos, un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

Todos los análisis y gráficos se realizaron con los programas estadísticos SigmaPlot 9.0 (Systat Software Inc. CA, EUA) y Graphpad Prism 6.01 (GraphPad Inc., CA, EUA), respectivamente.

8. Diseño experimental

8.1 Estandarización del modelo de fibromialgia

Inicialmente, los animales se habituaron a la manipulación y equipos correspondientes. Bajo estas condiciones se determinaron los valores basales de las conductas nociceptivas (umbral de retiro de la pata y umbral de presión muscular) en ambas patas traseras. Posteriormente, se administró la reserpina (1 mg/kg) o el vehículo (ácido acético glacial 0.5%) por vía subcutánea 3 días consecutivos. Se realizó una administración al día durante tres días consecutivos. Posteriormente, se midieron las conductas nociceptivas en los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 post administración (**Fig. 10**).

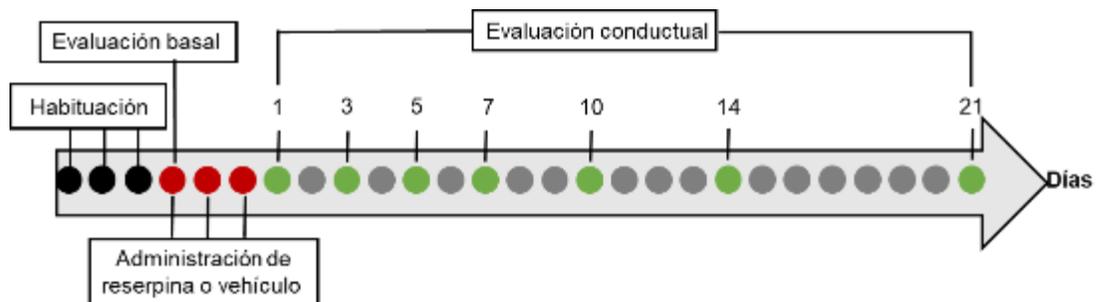


Fig. 10 Diseño experimental de la evaluación conductual correspondiente al modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina.

8.2 Caracterización de la fatiga muscular

Los animales se habituaron a la manipulación, pero no a los equipos utilizados; bajo estas condiciones se determinó la fatiga muscular. Se utilizaron grupos independientes de ratas ($n=6$). Las ratas de 5 días post administración de reserpina se sometieron a 30 ó 60 minutos de ejercicio con el rota-rod y después se determinaron las conductas exploratorias en la prueba de campo abierto (**Fig. 11**).

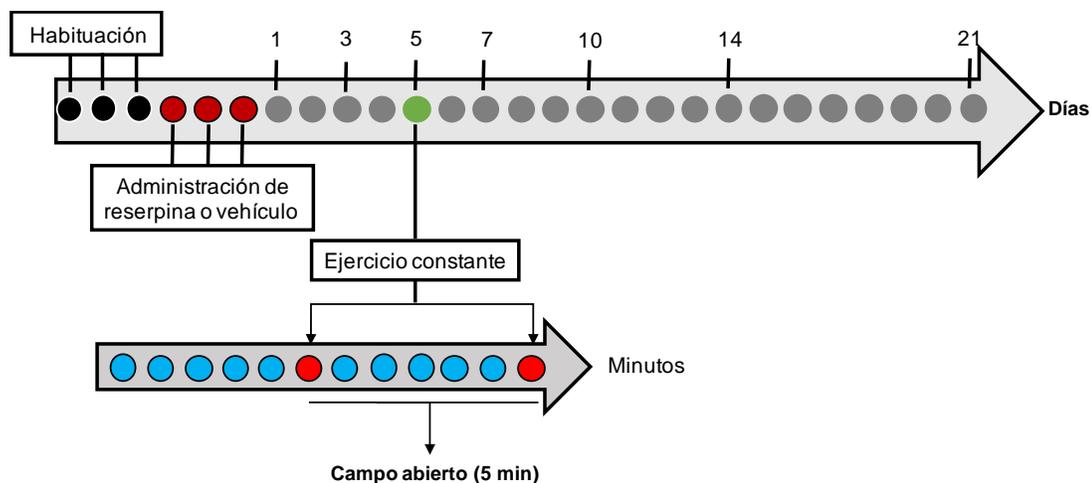


Fig. 11 Diseño experimental de la evaluación de la fatiga muscular en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina.

8.3 Evaluación farmacológica

Se utilizaron grupos independientes de ratas ($n=6$) para cada conducta nociceptiva y dosis evaluadas. Las ratas de 5 días post-administración recibieron la administración i.t. de vehículo (DMSO 100%) o dosis creciente de bumetanida (10-100 μg), furosemida (10-300 μg) o CLP 257 (10-300 μg), inhibidores de NKCC1 y activador del KCC2, respectivamente. El efecto antialodínico o antihiperalgésico se evaluó durante 6 horas en la pata derecha. De la misma manera, se determinó el efecto de la co-administración de bumetanida o furosemida (50 μg) más CLP 257 (50 μg) durante 6 horas (**Fig. 12**).

Por otro lado, se evaluó el efecto de las dosis más altas de los fármacos mencionados sobre las conductas nociceptivas en ratas *naïve*. La administración y el seguimiento del efecto se llevó a cabo de la misma manera que en las ratas tratadas con reserpina (**Fig. 13**).

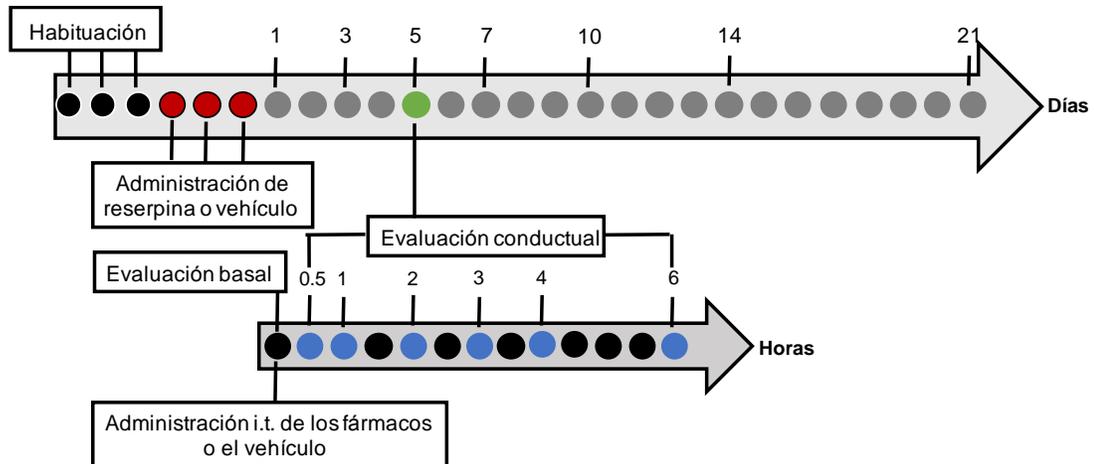


Fig. 12 Diseño experimental de la evaluación antialodínica y antihiperalgésica de los fármacos en ratas tratadas con reserpina.

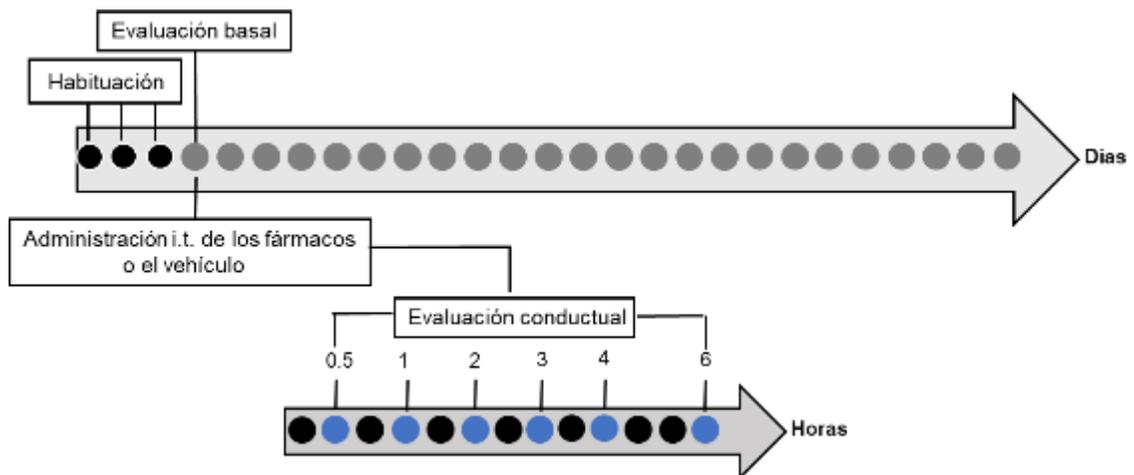


Fig. 13 Diseño experimental de la evaluación del efecto de los fármacos en ratas naïve.

8.4 Determinación de la expresión de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 por western blot

Se utilizaron grupos independientes (n=4). Los GRDs (L4-L6) y la porción dorsal de la médula espinal de las ratas se obtuvieron en los días 1, 3, 5, 7, 10 y 14 posteriores a la última administración de reserpina (**Fig. 17**).

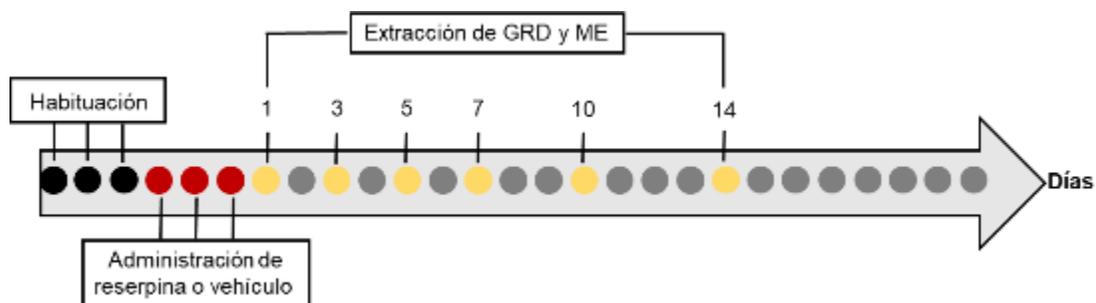


Fig. 14 Diseño experimental de la extracción de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y médula espinal (ME) para *western blot*.

9. Resultados

9.1 Estandarización del modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina

La administración subcutánea de reserpina (1 mg/kg) redujo el umbral de retiro tanto en la pata derecha como en la izquierda de ratas hembras (**Fig. 15A**). Dicho efecto se observó a partir del primer día post-administración y se mantuvo hasta el día catorce post-administración. El efecto máximo se observó al día 5, retornando a valores basales al día 21. Además, la reserpina disminuyó el umbral de presión muscular en ambas patas posteriores de ratas hembras (**Fig. 15B**). La administración de vehículo no produjo cambios significativos sobre el umbral de retiro y presión muscular de ratas hembras (**Fig. 15**).

De la misma manera, la reserpina disminuyó el umbral de retiro en ambas patas de ratas machos (**Fig. 16A**). En este caso el efecto máximo se presentó al día 5 post-administración y retornó a valores basales al día 14. Asimismo, la reserpina disminuyó de manera transitoria el umbral de presión muscular en ambas patas posteriores de ratas machos (**Fig. 16B**). El efecto máximo se alcanzó al día 5 post-administración. El vehículo no modificó los umbrales de retiro de la pata o presión muscular (**Fig. 16**).

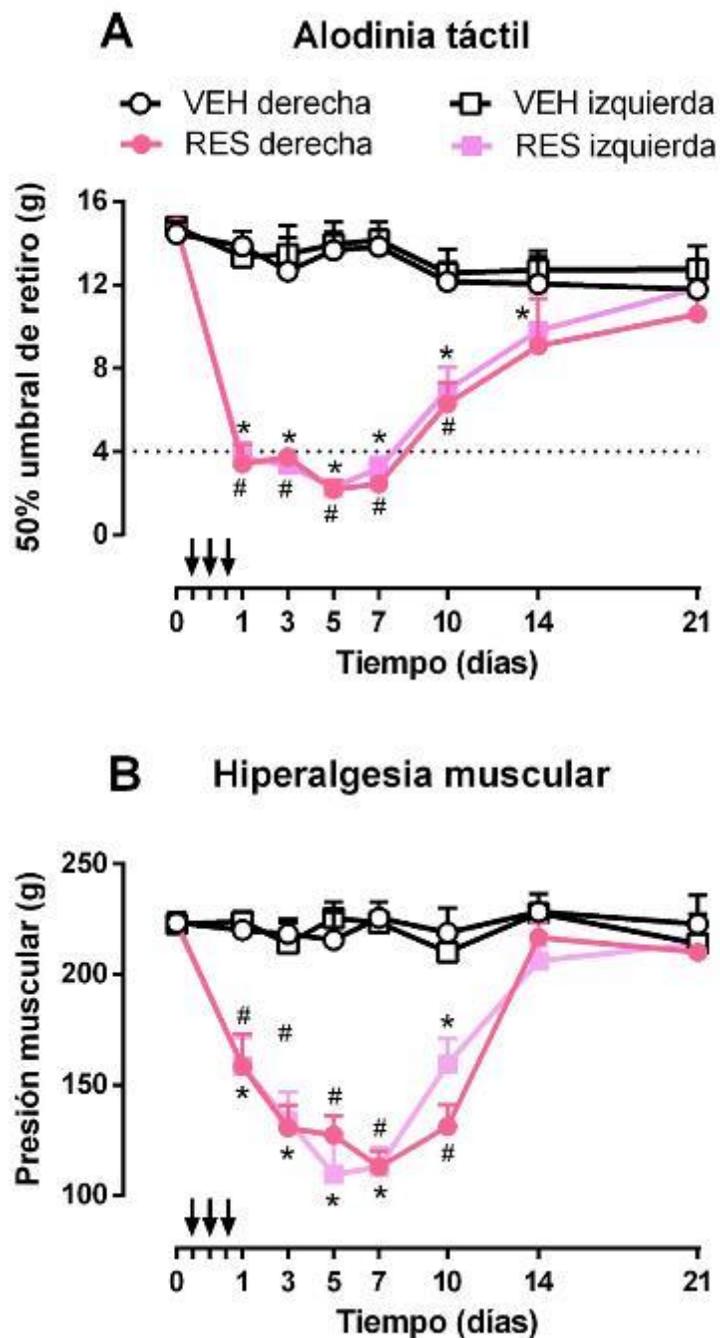


Fig. 15 Curso temporal de la alodinia (A) e hiperalgnesia (B) en ratas hembras. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. # $P < 0.05$ vs vehículo derecha; * $P < 0.05$ vs vehículo izquierda, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. Las flechas indican los tiempos de administración de reserpina (RES, 1 mg/kg) o vehículo (VEH).

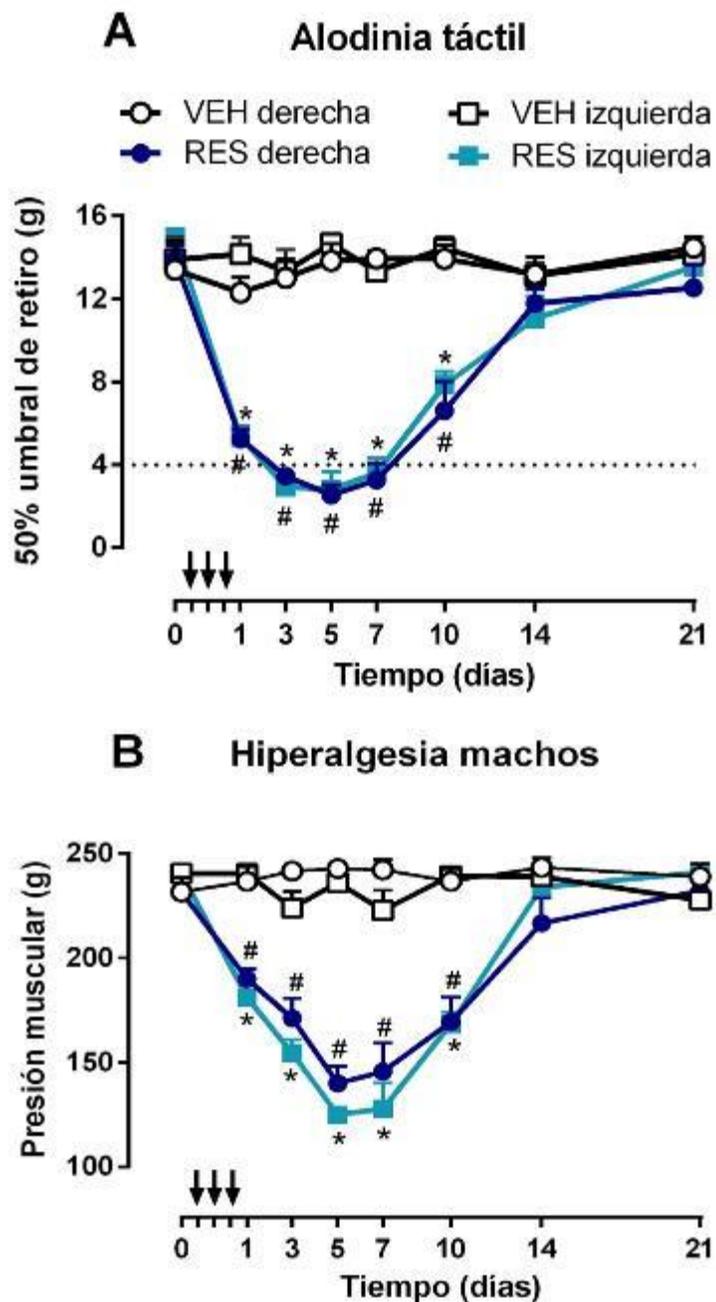


Fig. 16 Curso temporal de la alodinia (A) e hiperalgnesia (B) en ratas machos. Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. # $P < 0.05$ vs vehículo derecha. * $P < 0.05$ vehículo izquierda, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. Las flechas indican los tiempos de administración de reserpina (RES, 1 mg/kg) o vehículo (VEH).

La figura **17A** muestra que la administración de reserpina disminuyó el umbral de retiro de la pata izquierda y derecha de ratas machos y hembras. En la gráfica del área bajo la curva (**Fig. 17B**) se puede observar que no hay diferencias significativas entre machos y hembras. Igualmente, la reserpina disminuyó el umbral de presión muscular en ambas patas posteriores de ratas machos y hembras (**Fig. 17C**). Al comparar las áreas bajo la curva no existen diferencias significativas entre ambos grupos. Aunque se observaron diferencias significativas en tres tiempos al comparar machos contra hembras, el efecto global de la reserpina parece ser independiente del sexo de las ratas (**Fig. 17D**). Con base en estos resultados se decidió utilizar sólo ratas hembras para la realización de los experimentos subsecuentes.

9.2 Caracterización de la fatiga muscular en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina

La administración de reserpina en ratas sometidas a ejercicio 30 o 60 minutos disminuyó las conductas exploratorias (número de movimientos, distancia recorrida y porcentaje de actividad). En contraste, el vehículo no modificó las conductas exploratorias en ratas sometidas a ejercicio (**Fig. 18**). Lo anterior permite sugerir que la administración de reserpina induce fatiga muscular en ratas hembras.

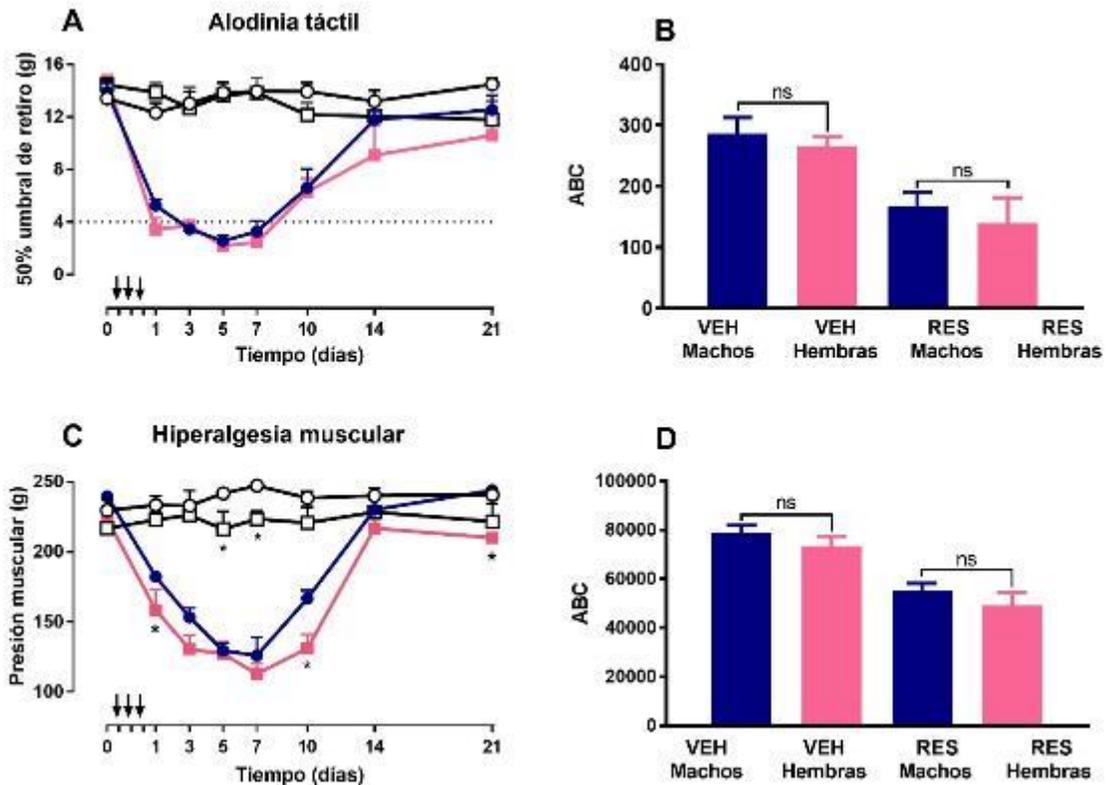


Fig. 17 Curso temporal de la alodinia e hiperalgnesia en ratas machos y hembras. **A** representa el curso temporal del 50% del umbral de retiro en la pata derecha de ratas machos y hembras. **B** representa el área bajo la curva de la alodinia táctil de ratas machos y hembras. **C** representa el curso temporal del umbral de presión muscular en la pata derecha de ratas machos y hembras. **D** representa el área bajo la curva de la hiperalgnesia de ratas machos y hembras. Para A y C, cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. *P < 0.05 vs RES hembras, por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. En el caso de B y D se realizó por ANOVA de una vía.

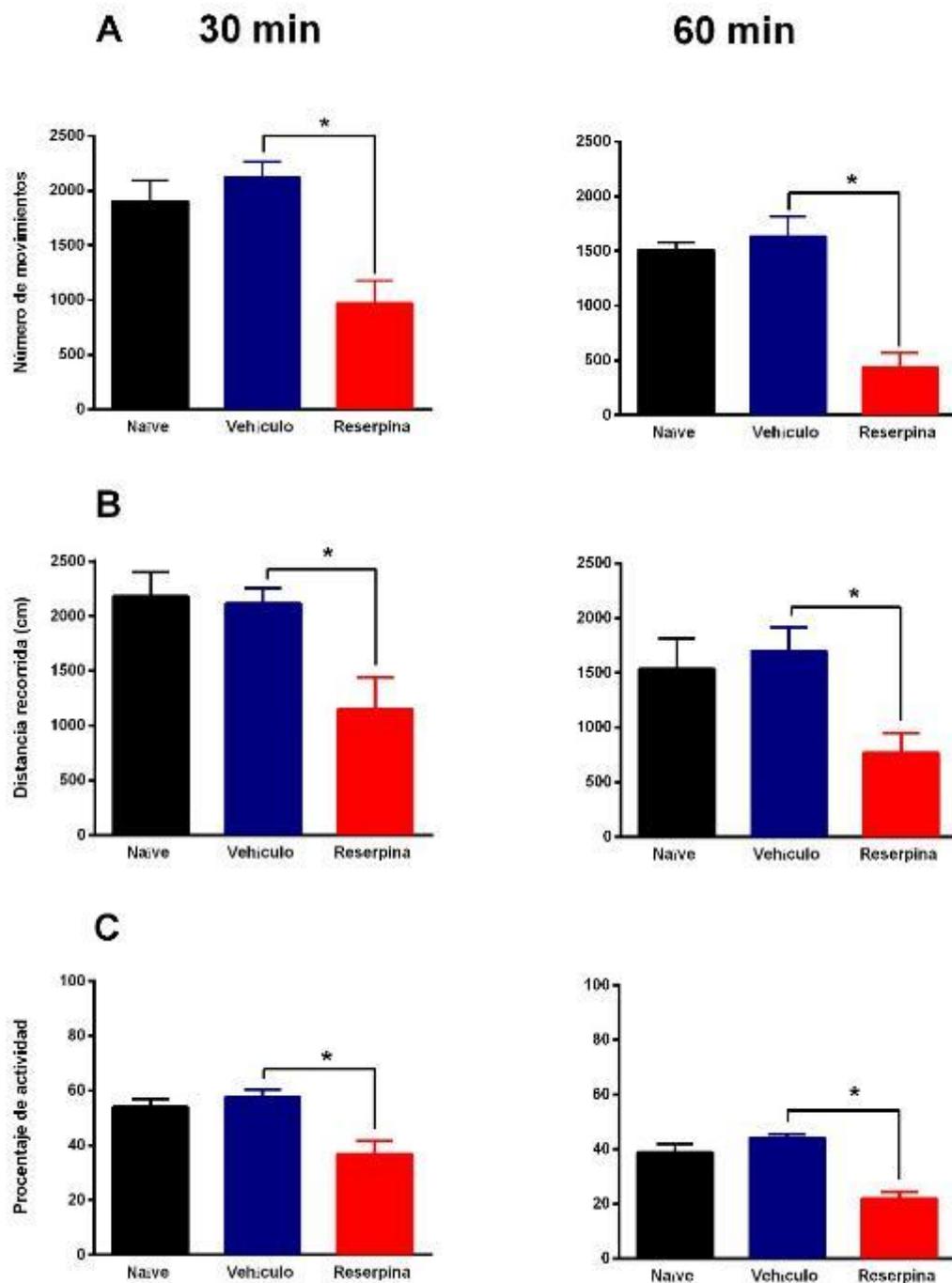


Fig. 18 Efecto de la administración de reserpina sobre la conducta de ambulación en ratas hembras en la prueba de campo abierto. **A** número de movimientos. **B** distancia recorrida. **C** porcentaje de actividad. Los datos representan el promedio de 6 ratas \pm EE. * $P < 0.05$ vs vehículo por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

9.3 Efecto de la administración de bumetanida sobre la alodinia táctil

La administración de bumetanida (100 μg) aumentó significativamente el umbral de retiro de la pata de ratas tratadas con reserpina. El efecto antialodínico máximo se alcanzó 1 hora post-administración y se mantuvo durante 3 horas (**Fig. 19A**). En contraste, las dosis de 50 y 10 μg de bumetanida no modificaron el umbral de retiro de las ratas hembras. El vehículo no modificó significativamente el umbral de retiro (**Fig. 19**).

9.4 Efecto de la administración de furosemida sobre la alodinia táctil

La administración de furosemida (100 y 300 μg) aumentó el umbral de retiro de la pata. El efecto antialodínico fue mayor con la dosis de 300 μg en comparación con la dosis de 100 μg . El efecto máximo de 300 μg de furosemida se alcanzó 30 minutos post-administración y disminuyó gradualmente hasta 6 horas posteriores a la administración (**Fig. 20A**). La furosemida (100 μg) aumentó el umbral de retiro a partir de la media hora post-administración, disminuyendo hasta regresar a valores iniciales. En contraste, la dosis de 10 μg de furosemida no modificó el umbral de retiro de las ratas hembras. El vehículo no modificó significativamente el umbral de retiro (**Fig. 20**).

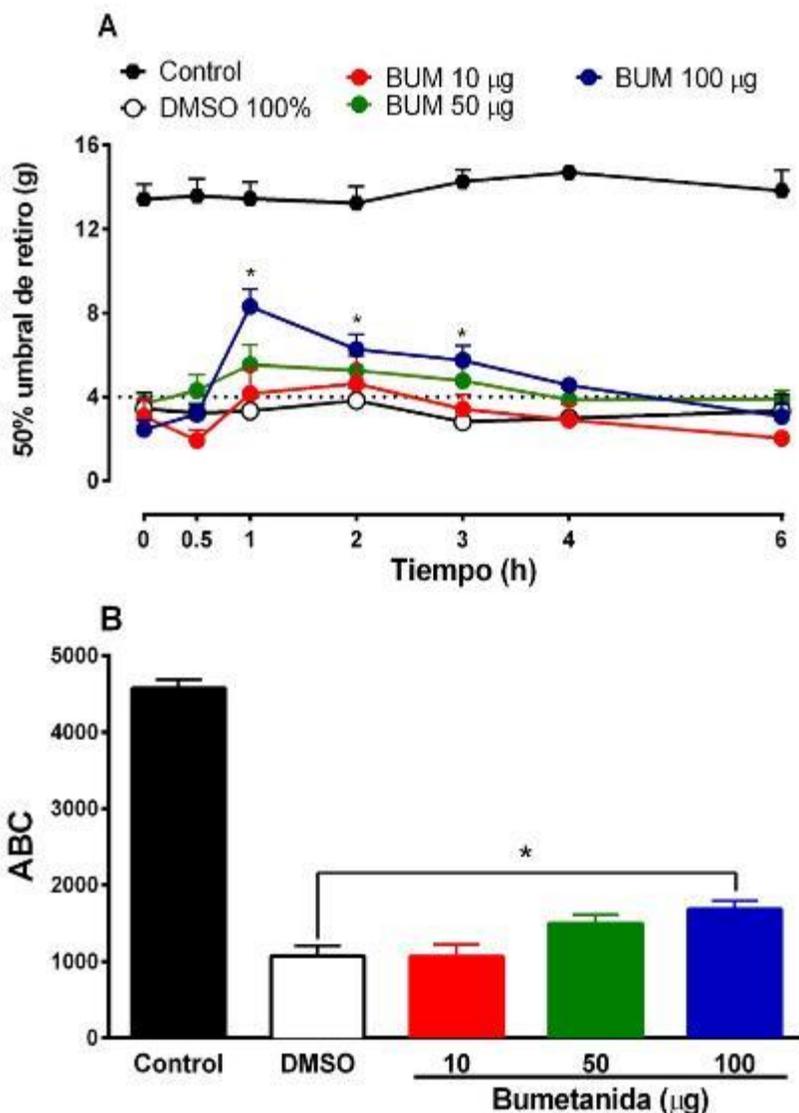


Fig. 19 Efecto de la bumetanida sobre la alodinia táctil. **A** representa los cursos temporales de las distintas dosis de bumetanida (BUM) 10-100 µg. Cada punto representa el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. **B** área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de las distintas dosis de bumetanida (10- 100 µg). Los datos representan el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs vehículo por ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de Tukey.

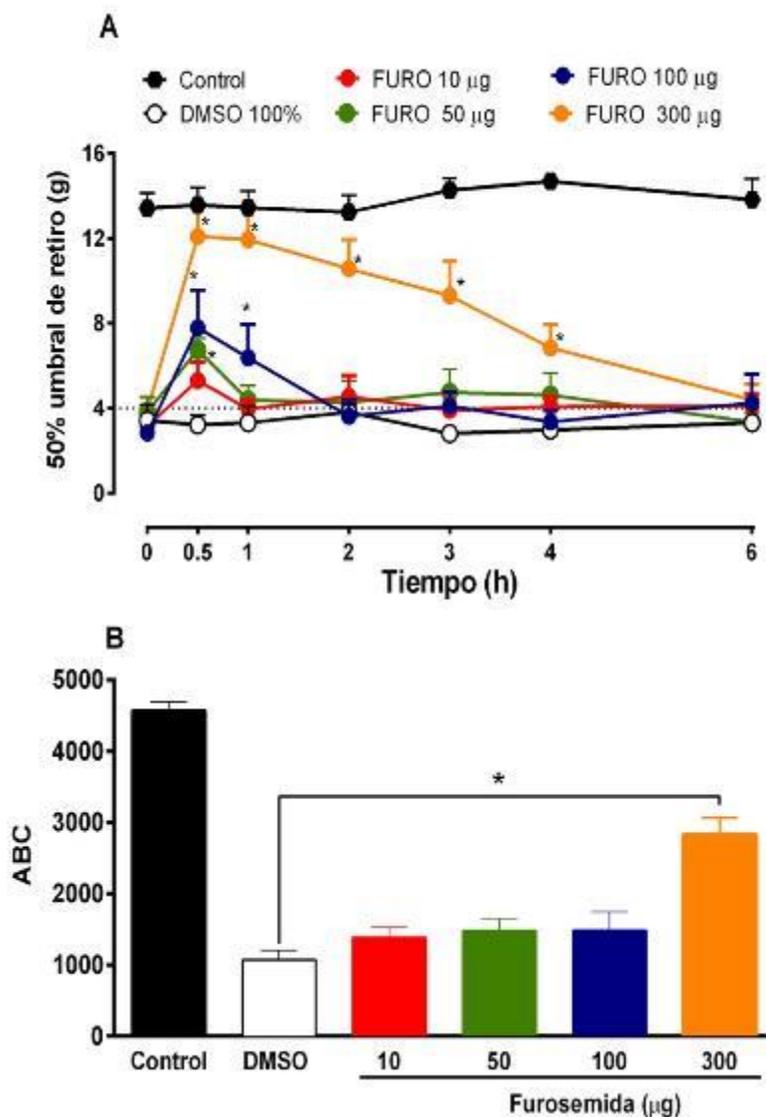


Fig. 20 Efecto de la furosemida sobre la alodinia táctil. **A** representa los cursos temporales de las distintas dosis de furosemida (FURO) 10-300 μg . Cada punto representa el promedio de 6 ratas \pm EE. * $P < 0.05$ vs vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. **B** área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de las distintas dosis de furosemida (10- 300 μg). Los datos representan el promedio de 6 ratas \pm EE. * $P < 0.05$ vs vehículo por ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de Tukey.

9.5 Efecto de la administración de CLP-257 sobre la alodinia táctil

La administración intratecal del activador de KCC2, CLP-257 (50-300 μg), revirtió la alodinia táctil inducida por reserpina en ratas hembras de manera dosis-dependiente (**Fig. 21**). El efecto mayor se observó con la dosis de 300 μg . Para dicha dosis, el efecto máximo se alcanzó 1 hora post-administración y disminuyó gradualmente hasta 6 horas posteriores a la administración (**Fig. 21A**). En contraste, el vehículo no modificó significativamente el umbral de retiro.

9.6 Efecto de la administración de bumetanida, CLP-257 y furosemida sobre la hiperalgia muscular

La bumetanida intratecal (300 μg) revirtió parcialmente la hiperalgia muscular inducida por reserpina. El efecto antinociceptivo máximo se alcanzó 30 minutos posteriores a la administración y disminuyó gradualmente hasta 6 horas post-administración. Además, la administración espinal de furosemida (300 μg) aumentó el umbral de presión muscular de las ratas hembras. El efecto antihiperalgésico mayor se observó 30 minutos post-administración y disminuyó gradualmente hasta 6 horas posteriores a la administración (**Fig. 22A**).

Por su parte, la dosis de CLP-257 (300 μg) disminuyó la hiperalgia muscular inducida por reserpina. El efecto antihiperalgésico máximo se alcanzó 30 minutos post-administración y se mantuvo durante 4 horas. En contraste, el vehículo no modificó de manera significativa el umbral de presión muscular (**Fig. 22B**).

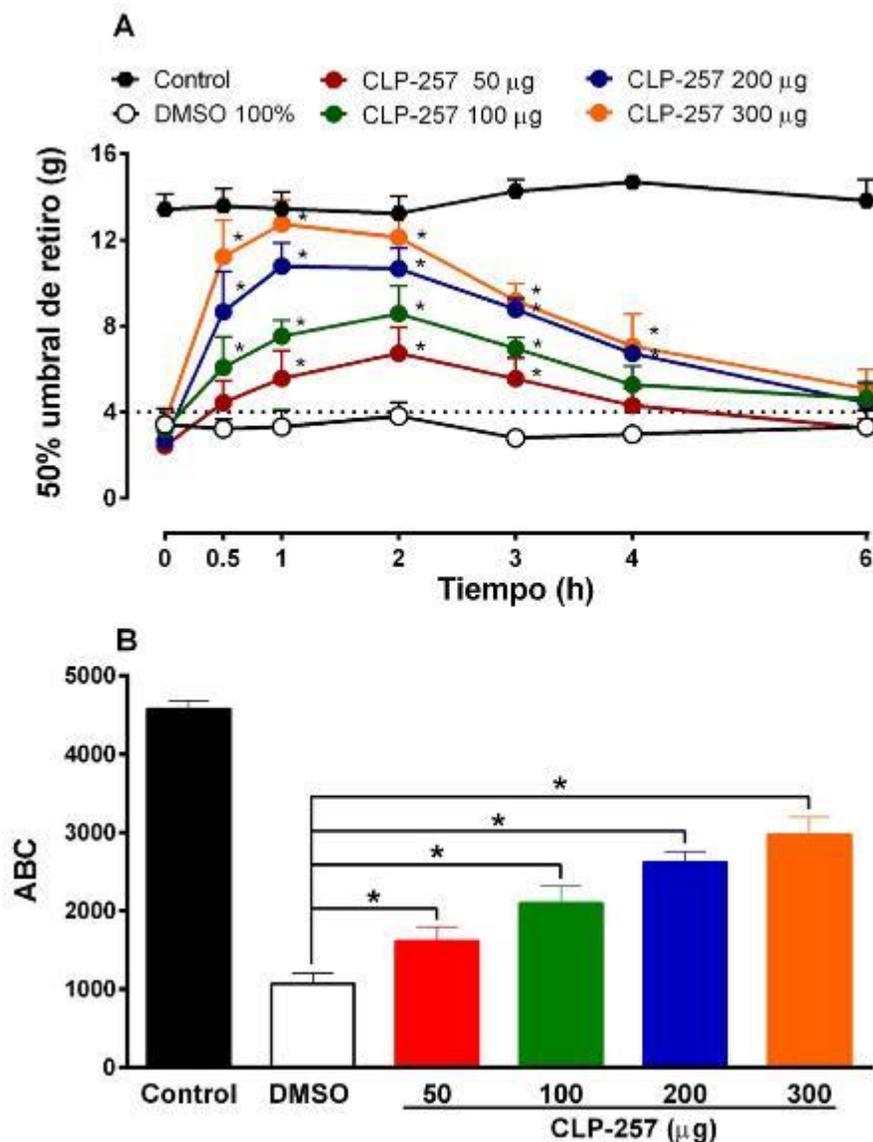


Fig. 21 Efecto del CLP-257 sobre la alodinia táctil. **A** representa los cursos temporales de las distintas dosis de CLP-257 (50-300 µg). Cada punto representa el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. **B** área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de las distintas dosis de CLP-257 (50- 300 µg). Los datos representan el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs vehículo por ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de Tukey.

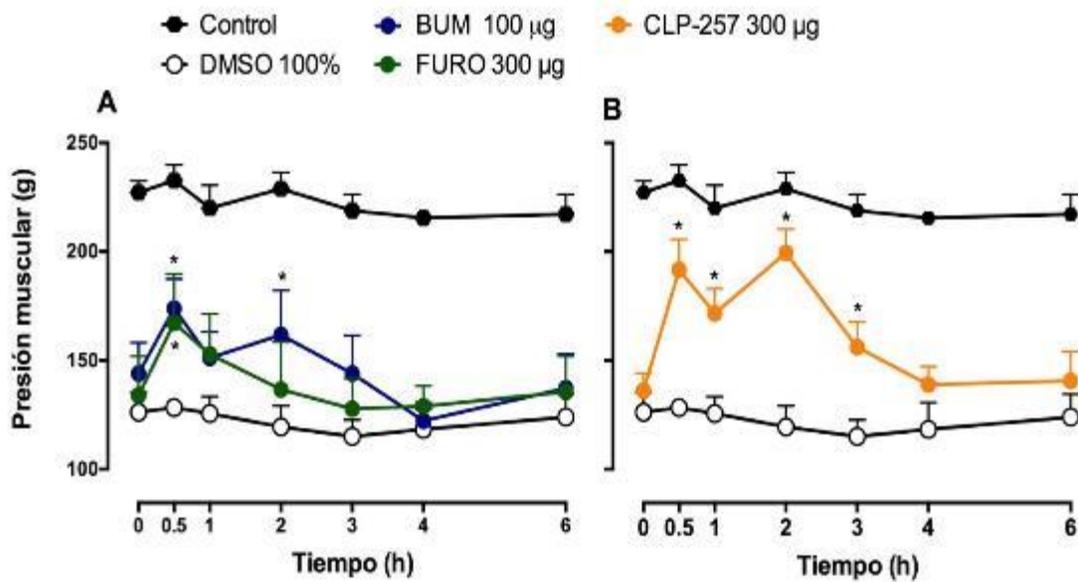


Fig. 22 Efecto de bumetanida, CLP-257 y furoseמידa sobre la hiperalgesia muscular. **A** representa los cursos temporales de la dosis de bumetanida (BUM) 300 µg y furoseמידa (FURO) 300 µg. **B** representa el curso temporal de la dosis de CLP-257 300 µg. Cada punto representa el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

9.7 Efecto de la co-administración de bumetanida o furosemida más CLP-257 en el modelo de fibromialgia inducido por la administración de reserpina

La co-administración de bumetanida (50 μ g) y CLP-257 (50 μ g) aumentó de manera parcial el umbral de retiro (**Fig. 23**). El efecto antialodínico se presentó desde la media hora post-administración alcanzando su pico máximo a las 3 horas. Dicho efecto se mantuvo hasta 4 horas post-administración y disminuyó gradualmente hasta regresar a valores basales (**Fig. 23A**). La combinación de bumetanida y CLP-257 produjo un efecto mayor al obtenido con bumetanida o CLP-257 por separado (**Fig. 23B**).

Por otra parte, la combinación de furosemida (50 μ g) y CLP-257 (50 μ g) presentó un efecto antinociceptivo en ratas hembras (**Fig. 24**). El efecto máximo se presentó 1 hora post-administración disminuyendo gradualmente hasta 4 horas posteriores a la administración (**Fig. 24A**). La coadministración de furosemida y CLP-257 produjo un efecto mayor al obtenido con furosemida o CLP-257 solos (**Fig. 24B**).

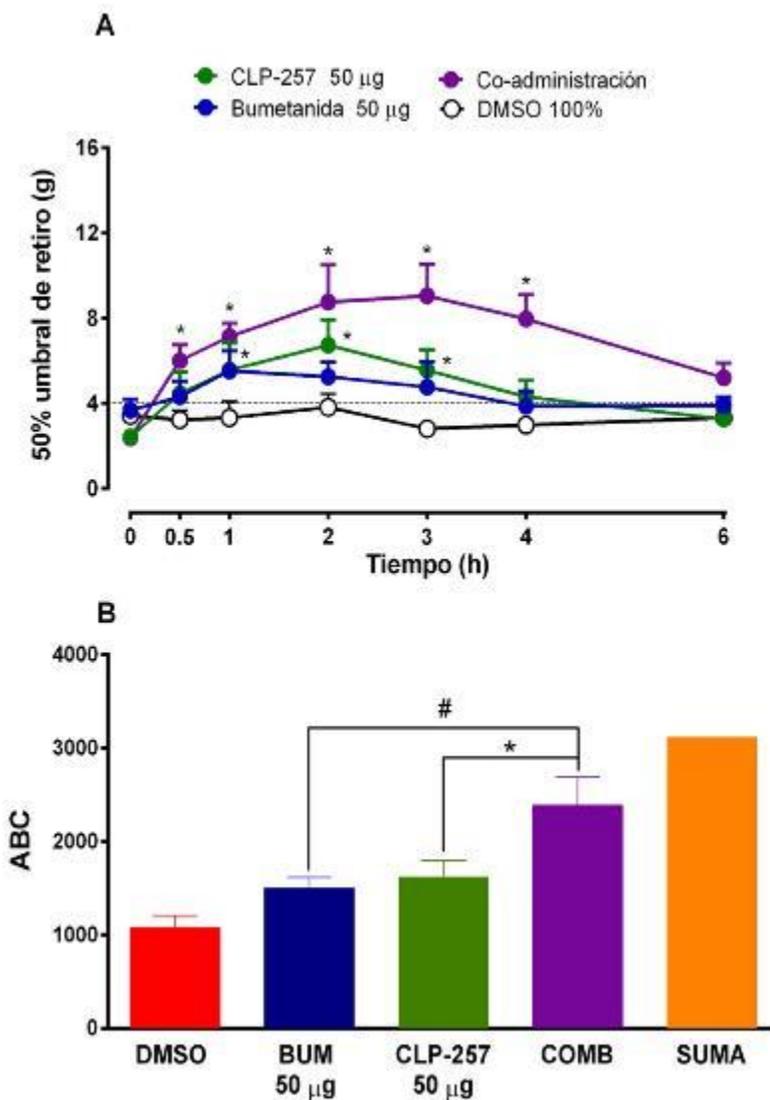


Fig. 23 Efecto de la co-administración de bumetanida y CLP-257 sobre la alodinia táctil. **A** representa los cursos temporales de la dosis de bumetanida (BUM) 50 µg y CLP-257 50 µg, así como su respectiva combinación (COMB). Cada punto representa los promedios de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs el vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. **B** área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de bumetanida 50 µg y CLP-257 µg, así como su respectiva combinación. Los datos representan el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs CLP-257 por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

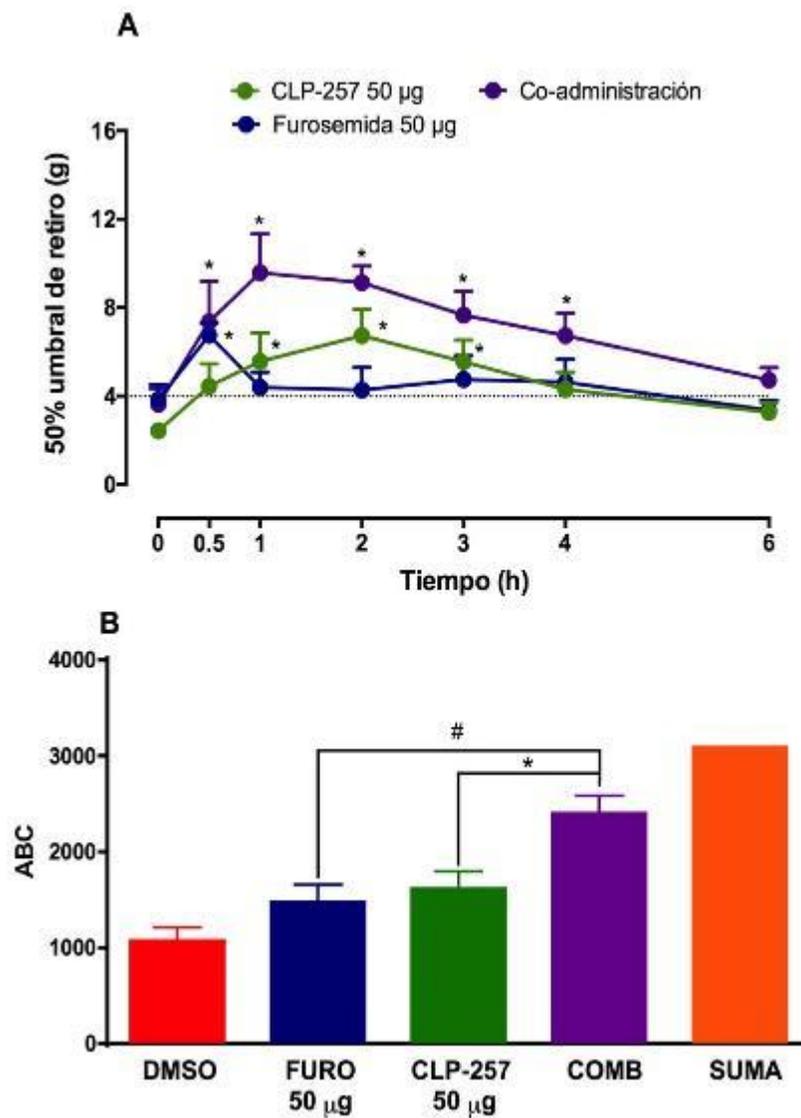


Fig. 24 Efecto de la co-administración de furosemida y CLP-257 sobre la alodinia táctil. **A** representa los cursos temporales de la dosis de furosemida (FURO) 50 µg y CLP-257 50 µg, así como su respectiva combinación (COMB). Cada punto representa los promedios de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs el vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. **B** área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de furosemida 50 µg y CLP-257 µg, así como su respectiva combinación. Los datos representan el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs CLP-257 por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

9.8 Efecto de la administración de bumetanida, CLP-257 y furosemida en ratas naïve

La administración intratecal de bumetanida, furosemida y CLP-257, así como del vehículo disminuyeron de manera transitoria el umbral de retiro y presión muscular una hora post-administración en las ratas hembras (**Fig. 25**). Además, la disminución del umbral de retiro inducida por CLP-257 se mantuvo hasta 2 horas post-administración (**Fig. 25B**). Es posible que lo anterior se deba al efecto irritante del vehículo (DMSO al 100%), ya que al comparar los fármacos de interés contra el vehículo no se observaron diferencias significativas.

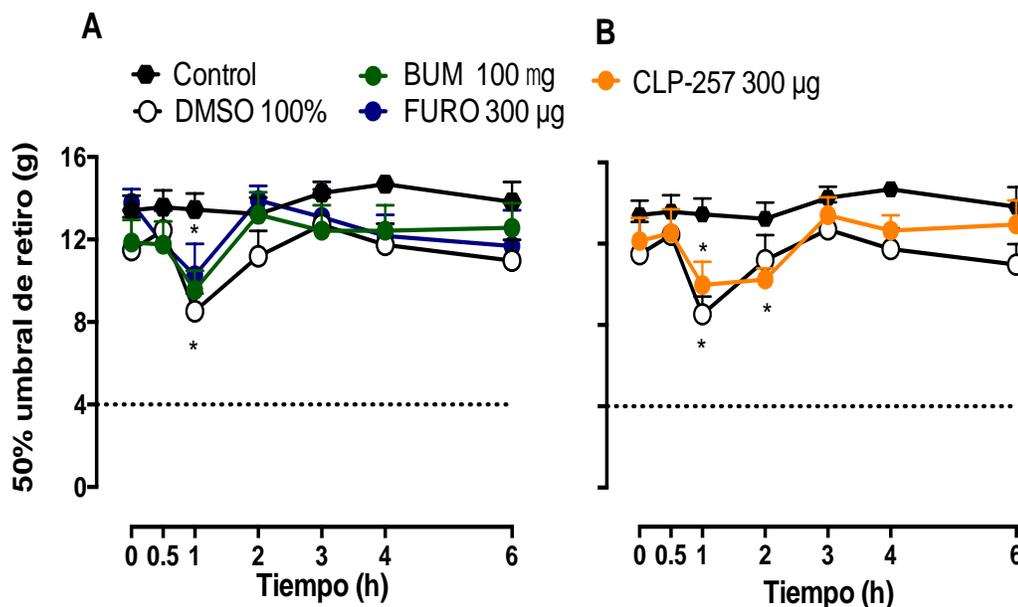


Fig. 25 Efecto de la bumetanida, CLP-257 y furosemida sobre el umbral de retiro en ratas naïve. **A** representa los cursos temporales de la dosis de bumetanida (BUM) 100 µg y furosemida (FURO) 300 µg. **B** representa el curso temporal de CLP-257 300 µg. Cada punto representa el promedio de 6 ratas ± EE. *P < 0.05 vs control por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

9.9 Determinación de la expresión de la proteína NKCC1 y KCC2 en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina

El *western blot* reveló una banda de aproximadamente 140 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína NKCC1, la cual se expresa de manera constitutiva en los GRD. La administración de reserpina incrementó la expresión de NKCC1 en los GRD a los 7 días post-administración en ratas hembras (**Fig. 26**).

Por otra parte, el *western blot* mostró una banda de aproximadamente 140 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína KCC2, la cual se expresa de manera constitutiva en la médula espinal. La administración de reserpina redujo de manera significativa la expresión de la proteína KCC2 a partir del día 3 post-administración en ratas hembras. Estos resultados sugieren que la administración de reserpina produce cambios en la expresión de la proteína NKCC1 y KCC2 en ratas hembras (**Fig. 27**).

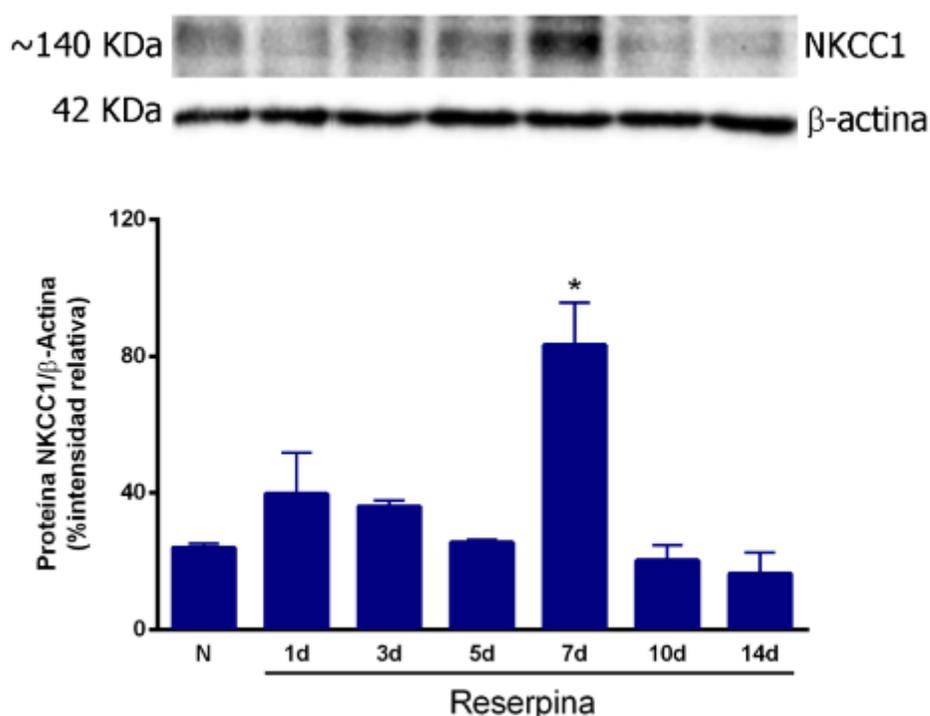


Fig. 26 Expresión de la proteína NKCC1 en los GRDs. Cada barra representa el promedio de 4 ratas \pm EE. * $P < 0.05$ vs naïve por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

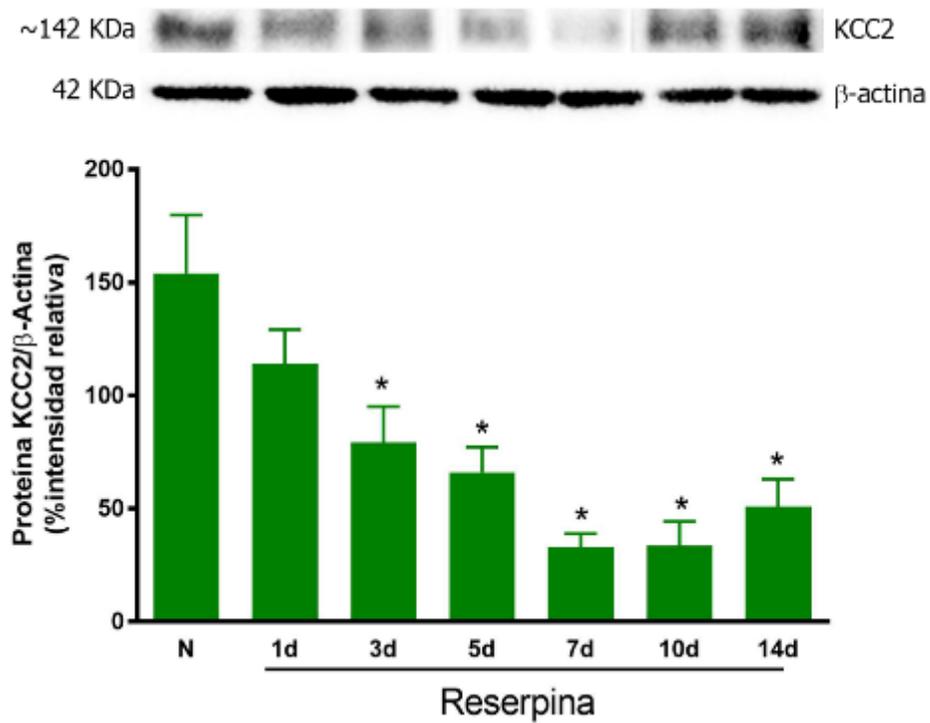


Fig. 27 Expresión de la proteína KCC2 en la médula espinal. Cada barra representa el promedio de 4 ratas \pm EE. * $P < 0.05$ vs naïve por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

10. Discusión

10.1 La reserpina produce hipersensibilidad generalizada en ratas hembras y machos

En el presente estudio se encontró que la administración de reserpina (1 mg/kg) subcutánea durante tres días consecutivos fue capaz de producir alodinia táctil e hiperalgesia muscular en ratas machos y hembras. Nuestros datos concuerdan con estudios donde se demuestra que la reserpina produce hipersensibilidad térmica, alodinia mecánica, alodinia al frío e hiperalgesia muscular indistintamente del sexo de los animales (Arora et al., 2011; Blasco-Serra et al., 2015; Hernández-León et al., 2017; Kaneko et al., 2014; Kulkarni, 1980; Kulkarni y Robert, 1982; Murai et al., 2015; Nagakura y Ito et al., 2012; Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013; Taguchi et al., 2015). En este sentido, Hernández-León et al. en 2018 demostraron que la reserpina modifica las conductas nociceptivas en ratas hembras de manera independiente de la fase del ciclo estral en que se encuentren las ratas (Hernández-León et al., 2017).

Nuestros datos son similares a lo reportado por otros grupos de investigación utilizando distintos modelos de fibromialgia tales como solución salina ácida (Chen et al., 2014; Gandhi et al., 2004; Hoeger-Bement y Sluka, 2003; Lin et al., 2015; Siqueira-Lima et al., 2017; Skyba et al., 2005; Sluka y Audette, 2006; Sluka et al., 2001; Sluka et al., 2003; Yen et al., 2017), PGE₂ (*priming*) (Álvarez et al., 2014; Kim et al., 2015; Tillu et al., 2015) y estrés (Cheng et al., 2011; Green et al., 2011; Khasar et al., 2009; Nazeri et al., 2018; Yasui et al., 2014) en ratas y/o ratones. Nuestros datos muestran que la reserpina produce hipersensibilidad mecánica y muscular en ambas patas de ratas hembras y machos. Por lo tanto, se puede sugerir que la administración de reserpina es capaz de generar un modelo de dolor generalizado. En apoyo a nuestros datos, hay evidencia que indica que la administración de dicha sustancia (Nagakura et al., 2009), el estrés (Khasar et al., 2009; Nishiyori y Ueda, 2008; Quintero et al., 2000; Yasui et al., 2014) o la combinación de ambos (Gregory

et al., 2013) producen hipersensibilidad generalizada en ratas machos y hembras.

Se sabe que la reserpina se une de manera irreversible al transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Esto impide la vesiculación y el almacenamiento de 5-HT, noradrenalina y dopamina (Mandela et al., 2010). A pesar de que la fisiopatología de la fibromialgia es desconocida, se cree que los mecanismos involucrados en dicho padecimiento están relacionados con una disfunción en los sistemas facilitadores e inhibidores de la modulación descendente del dolor (Julien et al., 2005; Kiso et al., 2018). En este sentido, se ha reportado que la disfunción de los sistemas monoaminérgicos incrementa la sensibilidad al dolor (Ossipov et al., 2014; Tamano et al., 2016; Vanegas y Schaible, 2004).

La 5-HT y la noradrenalina son las principales monoaminas involucradas en los sistemas analgésicos endógenos dentro de la médula espinal (Oe et al., 2010). Se ha reportado que la activación de los receptores 5-HT_{2C} en la médula espinal resulta en un efecto analgésico en ratas reserpinizadas (Ogino et al., 2013). Además, dicho receptor también está involucrado en la disminución de la hiperalgesia inducida por estrés en ratones (Nishiyori et al., 2010). Asimismo, se ha demostrado que la inhibición del transportador de serotonina (SERT) y noradrenalina (NAT) reduce la hiperalgesia muscular inducida por reserpina (Murai et al., 2015). En contraste, otros estudios han demostrado que la activación de los receptores 5-HT_{2C} espinales promueven el dolor inducido por formalina de larga duración (Cervantes-Durán et al., 2013). Está claro que la 5-HT puede ser pronociceptiva o antinociceptiva dependiendo del subtipo de receptor de 5-HT que sea activado. En este sentido, se ha reportado que la activación de los receptores 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ a nivel espinal promueve el desarrollo y mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia en el modelo de formalina de larga duración (Bravo-Hernández et al., 2012; Godínez-Chaparro et al., 2012). Por tanto, no se puede descartar la

participación de los receptores serotoninérgicos, ya sean excitadores o inhibidores, en el mantenimiento de la alodinia táctil e hiperalgesia muscular observadas en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina en ratas.

Existe poca evidencia acerca del papel de los receptores adrenérgicos en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina. Sin embargo, la evidencia apunta a que la administración de adrenalina exógena aumenta la hiperalgesia inducida por estrés (Khasar et al., 2008). Además, se sabe que los genes que modulan la señalización mediada por el receptor β -adrenérgico, así como la catecol-O-metiltransferasa (COMT), afectan la sensibilidad al dolor (Nackley et al., 2007). Las variantes genéticas de la COMT son predictivas para el desarrollo del trastorno temporomandibular y/o síndrome de dolor generalizado (Diatchenko et al., 2005). En consonancia con esta idea, se ha mostrado que el antagonista no selectivo del receptor β -adrenérgico, pindolol, reduce la hipersensibilidad al dolor en mujeres con fibromialgia (Wood et al., 2005).

Se ha sugerido que los canales sensibles a ácido 3 (ASIC3) están involucrados en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por reserpina (Taguchi et al., 2015). La reserpina aumentó los niveles del ARNm de dichos canales en los GRD, mientras que la administración de APETx2, un inhibidor selectivo de los ASIC3, revirtió la hiperalgesia mecánica inducida por reserpina (Taguchi et al., 2015). Otro grupo de trabajo demostró que la administración de solución salina ácida produce un aumento en la expresión del ARNm del ASIC3 en la médula espinal y tálamo de ratones y ese efecto se revierte en ratones que no expresan los canales ASIC3 (Yen et al., 2017).

10.2 La reserpina induce conductas tipo fatiga en ratas hembras

El presente estudio demostró que la administración de reserpina produjo conductas de fatiga en ratas hembras. En particular, se observó que el

ejercicio por 30 ó 60 minutos produce fatiga muscular en ratas previamente inyectadas con reserpina. Nuestros resultados confirman la evidencia previa que indica que la administración de reserpina disminuye la distancia recorrida por las ratas reserpinizadas (Favero et al., 2017). Acorde con lo anterior, se puede sugerir que la reducción en la actividad de locomoción y la distancia recorrida podría estar relacionada con hiperalgesia muscular, alodinia táctil y sensibilidad característica del modelo de fibromialgia inducido por reserpina. Además, Gregory et al. (2013) demostraron que el ejercicio fatigante produce hiperalgesia muscular en ratas hembras y machos tal y como se observa en nuestros resultados (Gregory et al., 2013). Se sabe que el ejercicio provoca la liberación de H^+ , lactato y ATP que tienen la capacidad de sensibilizar a los nociceptores musculares y generar hiperalgesia muscular (Hoheisel et al., 2004; Immke y McCleskey, 2001; Voss, 2009). Asimismo, se ha reportado que los H^+ y el ATP pueden activar a los ASICs y receptores purinérgicos, respectivamente, los cuales juegan un papel importante en el procesamiento del dolor (Barragán-Iglesias et al., 2016; Hori et al., 2010; Sluka et al., 2007; Yen et al., 2017). Por lo tanto, es probable que esto pueda explicar el efecto del ejercicio en ratas tratadas con reserpina.

Se ha demostrado que el modelo de reserpina provoca un aumento de la expresión del canal ASIC3 en el GRD (Taguchi et al., 2015). Además, el ejercicio fatigante provoca un aumento en el número de linfocitos infiltrados en el musculo fatigado (Gregory et al., 2013). Este tipo celular tiene el potencial de generar dolor debido a la liberación de agentes pro-algesicos como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ y prostaglandinas (Moalem et al., 2004; Sluka y Rasmussen, 2010). En conjunto, lo anterior nos permite sugerir que la liberación de metabolitos fatigantes, la sobreexpresión del canal ASIC3 y el aumento en el número de células infiltradas podrían explicar la fatiga muscular observada en nuestro modelo. Sin embargo, dichos mecanismos no han sido evaluados y, por tanto, es necesario investigar al respecto.

La desregulación de la transmisión serotoninérgica está implicada en desordenes de estrés y fatiga (Cao y Li, 2017). Hay evidencia que demuestra que la 5-HT participa en ciertas condiciones psicológicas asociadas con la fatiga tales como el letargo y el sueño (Eccleston, 1982; Graeff et al., 1996). Se ha reportado que después del ejercicio exhaustivo hay un aumento en las concentraciones de 5-HT en el cerebro alterando la percepción de la fatiga (Cao y Li, 2017). Se sabe que en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina hay una disminución en la concentración de 5-HT (Nagakura et al., 2009). Por tanto, es posible que las concentraciones de 5-HT no aumenten después del ejercicio exhaustivo y, por tanto, la percepción de la fatiga sea mayor. Por lo anterior, la fatiga muscular inducida por la administración de reserpina podría estar mediada por un mecanismo dependiente de 5-HT.

A pesar de que la etiología de la fatiga es incierta, existen estudios que han reportado una relación entre la fatiga y la depresión. Esto se basa en que la fatiga y la depresión comparten ciertas estructuras cerebrales que incluyen el hipocampo y la corteza prefrontal, la cuales son estructuras con una alta concentración de receptores a 5-HT (Murphy et al., 2008). Además, se ha reportado que ambos padecimientos presentan una alteración en los niveles de 5-HT (Cao y Li, 2017). En este sentido, la mayoría de los pacientes con fatiga tienen una comorbilidad elevada de trastornos psicológicos entre los que destaca la depresión. Tales observaciones parecen sugerir que la fatiga tiene una relación muy estrecha con procesos psicológicos (Sandín, 2005). Aunque tales mecanismos no fueron evaluados en el presente proyecto, es necesario investigar al respecto para poder establecer una postura más concreta sobre dicha aseveración.

10.3 Los co-transportadores de cloruro participan en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por reserpina

Los resultados de este estudio sugieren que los co-transportadores NKCC1 y KCC2 participan en la modulación de la alodinia táctil e hiperalgesia muscular

inducidas por reserpina. Esta sugerencia está sustentada en lo siguiente: 1) la administración i.t. de bumetanida o furosemida, inhibidores del co-transportador NKCC1, reduce las conductas nociceptivas; 2) la administración i.t. de CLP-257, activador del co-transportador KCC2, aumenta el umbral de retiro de la pata y 3) el tratamiento con la co-administración de bumetanida o furosemida más CLP-257 disminuye la alodinia mecánica en ratas tratadas con reserpina. Hasta donde tenemos conocimiento, éste es el primer trabajo en evaluar la participación de los co-transportadores de cloruro, NKCC1 y KCC2, en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. Nuestro trabajo concuerda con estudios previos que demostraron un efecto antinociceptivo de la bumetanida en un modelo de dolor inflamatorio (Granados-Soto et al., 2005; Kim et al., 2017; Yousuf et al., 2017), neuropático (Ahmed et al., 2014; Chen et al., 2014; Cramer et al., 2008; Hasbargen et al., 2010; Mòdol et al., 2014) y funcional (inducido por estrés o restricción de sueño) (Gao et al., 2016; Wei et al., 2010).

En el presente trabajo se observó que la furosemida produjo un efecto antinociceptivo en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina. El efecto de la furosemida fue mayor al obtenido con bumetanida. Esta diferencia en el efecto podría explicarse por las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de ambos fármacos. Los parámetros farmacocinéticos reportados para la furosemida son los siguientes: vida media de eliminación de 2.5, concentración máxima (C_{max}) de 8,580 ng/ml, volumen de distribución de 24.4 l, coeficiente de partición de 0.025 y pKa de 3.9 (Granero et al., 2009; Kramer, 1990; Sica et al., 2018). Para la bumetanida se ha reportado que tiene una vida media de 1.5 h, C_{max} de 117.7 ng/ml⁻¹, volumen de distribución de 9.8 l, coeficiente de partición de 0.43 y pKa de 3.6 (Kramer, 1990; Song et al., 2011). Por tanto, es posible que la diferencia en los efectos sea por las características cinéticas de cada fármaco. Asimismo, se sabe que la bumetanida inhibe al co-transportador NKCC1, mientras que la furosemida es capaz de inhibir al co-transportador NKCC1 y KCC2 (Payne et al., 2003). En

este sentido, se ha reportado que el antagonismo del KCC2 produce dolor en animales intactos (Delpire et al., 2009; Huang et al., 2016; Jolivald et al., 2008). Por lo tanto, el efecto antialodínico de la furosemida no puede ser explicado a través del antagonismo del co-transportador KCC2. Además, se ha reportado que la fibromialgia inducida por reserpina produce pérdida de la función inhibitoria de los receptores GABA_A- α_5 (De la Luz-Cuellar, 2018). Por lo anterior, es posible especular que la administración de reserpina pueda inducir un fenómeno similar en los receptores GABA_A- α_6 . En este sentido, se sabe que la furosemida es capaz de inhibir a dichos receptores (Andres et al., 2014). Por lo tanto, el efecto antialodínico de la furosemida, en cierta medida, podría ser explicado a través del antagonismo del receptor GABA_A- α_6 .

El presente trabajo demostró que el CLP-257 revierte la hipersensibilidad inducida por reserpina. Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte del efecto antialodínico del CLP-257 en un modelo de dolor funcional. Sin embargo, un estudio previo reportó que la administración i.t. de CLP-257 revirtió la alodinia mecánica e hiperalgesia muscular en animales neuropáticos (Gagnon et al., 2013). En este sentido, también se ha reportado que el CLP-257 redujo la alodinia mecánica inducida por morfina (Ferrini et al., 2017).

Dado que la pérdida de la homeostasis del Cl⁻ es un fenómeno global y no un fenómeno aislado como se ha abordado en trabajos previos (Chen et al., 2014; Galan y Cervero, 2005; Granados-Soto et al., 2005), decidimos evaluar un posible sinergismo farmacológico entre ambos co-transportadores. El tratamiento i.t. con la combinación de bumetanida o furosemida y CLP-257 disminuyó la alodinia mecánica en ratas reserpinizadas. Hasta donde tenemos conocimiento, este estudio es el primero que evalúa el efecto de la co-administración de los inhibidores de NKCC1 y el activador de KCC2 en un modelo de dolor funcional. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que

ambos co-transportadores son responsables parcialmente de la hipersensibilidad inducida por reserpina en la rata.

Está claro que los co-transportadores de Cl⁻ tienen un papel importante en el control de la información nociceptiva (Galan y Cervero, 2005; Laird et al., 2004; Price et al., 2005; Sung et al., 2000). No obstante, el daño al tejido o al nervio parece cambiar la función de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 y, por tanto, la función de los receptores GABA_A (Coull et al., 2005; Prescott et al., 2006; Zeilhofer et al., 2012). En este sentido, se ha reportado que ratones *knock out* de NKCC1 muestran un aumento en la latencia de retiro de la pata y cola a estímulos térmicos (Laird et al., 2004; Sung et al., 2000). Por otra parte, existe evidencia que muestra que el tratamiento con un siRNA contra KCC2 produce hiperalgesia térmica y alodinia mecánica en ratas intactas (Lin et al., 2017). De manera interesante, se ha demostrado que la inhibición espinal del KCC2 en ratas intactas por DIOA aumenta las conductas nociceptivas (Delpire et al., 2009; Huang et al., 2016; Jolivald et al., 2008). Por consiguiente, bajo condiciones patológicas de dolor, tal como la fibromialgia, el co-transportador NKCC1 y el receptor GABA_A podrían estar sobreactivados (Farrant y Nusser, 2005). Lo anterior podría conducir a un estado de excitabilidad tónica de las fibras aferentes primarias, reduciendo su umbral de activación y produciendo RRD (Loeza-Alcocer et al., 2013; Pitcher y Cervero, 2010). De acuerdo con lo anterior, se ha reportado que la administración i.t. de bumetanida previene la aparición de inflamación neurogénica e hiperalgesia secundaria generada por la administración de capsaicina (Valencia-de Ita et al., 2006) y reduce la frecuencia de disparo de los nociceptores espinales y neuronas de amplio rango dinámico en el asta dorsal de la médula espinal (Pitcher y Cervero, 2010). Además, este mismo fenómeno podría estar sucediendo en la médula espinal como consecuencia de la reducción en la expresión del co-transportador KCC2 (Coull et al., 2005; Zhang et al., 2013) induciendo pérdida de la inhibición GABAérgica. Además, se ha reportado que el incremento de la expresión de KCC2 restaura parcialmente la inhibición

espinal GABAérgica y glicinérgica (inhibición post-sináptica) (Lin et al., 2017). Nuestros datos apoyan la idea de que la reducción de la actividad del co-transportador NKCC1 y el aumento de la actividad del co-transportador KCC2 mediante aproximaciones farmacológicas restauran la inhibición GABAérgica a nivel pre- y post-sináptico lo que resulta en la reducción de la excitabilidad en las aferentes primarias y de las neuronas de proyección y, por lo tanto, del dolor inducido por reserpina.

10.4 Los co-transportadores de cloruro participan en el mantenimiento de la hiperalgesia muscular inducida por reserpina

Este trabajo demuestra que el bloqueo del co-transportador NKCC1 y la activación del co-transportador KCC2 tiene un efecto significativo sobre la disminución del umbral de presión muscular observada en ratas con fibromialgia inducida por reserpina. Existe evidencia que indica que la hiperalgesia muscular está mediada por la presencia de factores inflamatorios, tales como IL-6, sustancia P, glutamato, NGF y H⁺ (Dina et al., 2008; Lin et al., 2012; Mizumura, 2009; Sluka et al., 2003). Se ha sugerido que el estrés oxidativo podría estar participando en las alteraciones que se producen en las fibras musculares en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina (Favero et al., 2017). Dado que el efecto de bumetanida y furosemida es relativamente pequeño comparado con el efecto del CLP-257, nuestros resultados sugieren que el co-transportador NKCC1 tiene un papel secundario comparado con el del KCC2 en la modulación de la hiperalgesia muscular en este modelo de fibromialgia.

10.5 La reserpina produce cambios en la expresión de la proteína de los co-transportadores NKCC1 y KCC2

Los co-transportadores NKCC1 y KCC2 se expresan en los GRD y en la parte dorsal de la médula espinal, respectivamente, en ratas naïve y ratas tratadas con reserpina. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que demuestran la expresión de la proteína de dichos co-transportadores en estos

sitios (Álvarez-Leefmans et al., 2001; Cramer et al., 2008; Hasbargen et al., 2010; He et al., 2014; Mòdol et al., 2014; Wei et al., 2013; Yousuf et al., 2017; Zhu et al., 2012). En este trabajo, se observó que la reserpina aumentó la expresión del co-transportador NKCC1 y disminuyó la expresión del co-transportador KCC2 en los GRD y médula espinal, respectivamente. Los cambios observados se relacionan con el aumento en las conductas nociceptivas de ratas reserpinizadas. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en realizar un curso temporal de la expresión de los co-transportadores de Cl⁻ en un modelo de fibromialgia inducido por reserpina en ratas. De acuerdo con nuestros resultados, se reportó que el dolor neuropático aumenta la expresión de la proteína NKCC1 en los GRD (Mòdol et al., 2014; Wei et al., 2013). Además, se ha reportado que el estrés aumenta la expresión de la proteína NKCC1 en neuronas granulares del hipocampo de ratones (Tsukahara et al., 2015) y en neuronas de núcleo paraventricular (Gao et al., 2016). Asimismo, existe evidencia que el dolor neuropático e inflamatorio disminuye la expresión de la proteína de KCC2 (Cramer et al., 2008; Hasbargen et al., 2010; He et al., 2014). En apoyo a nuestros datos, nuestro grupo de trabajo demostró que el estrés crónico reduce la expresión de la proteína KCC2 en la parte dorsal de la médula espinal de ratas sometidas a estrés crónico (Curiel-Gómez, 2018).

Se ha reportado que la actividad de los co-transportadores estudiados puede ser modulada por fosforilación (Galan y Cervero, 2005; Lagraize et al., 2010; Mòdol et al., 2014; Zhu et al., 2012). Por ejemplo, se ha reportado que el co-transportador NKCC1 es susceptible a la fosforilación por cinasas como SPAK y OSR1 (Delpire y Austin, 2010; Price et al., 2009). La fosforilación de NKCC1 aumenta su actividad y provoca mayor movilización de este co-transportador hacia la membrana en el dolor inflamatorio y neuropático (Lagraize et al., 2010; Mòdol et al., 2014; Zhu et al., 2012). De manera interesante, se ha reportado que la administración i.t. de bumetanida revirtió la alodinia táctil y aumentó la expresión del co-transportador NKCC1 en los GRD (Mòdol et al., 2014).

Además, también se reportó que el estrés crónico redujo la fosforilación de la proteína KCC2 (Curiel-Gómez, 2018), sugiriendo una relación entre la expresión de los co-transportadores y el procesamiento del dolor. En conjunto, los datos sugieren que los co-transportadores NKCC1 y KCC2 participan en el desarrollo y mantenimiento del dolor funcional.

Se ha reportado que el tratamiento con reserpina induce la activación de la microglía y astrocitos en el asta dorsal de la médula espinal (De la luz-Cuellar, 2018; Taguchi et al., 2015). Se sabe que la activación de la microglía participa en el establecimiento de la sensibilización central, así como en la inducción y mantenimiento del dolor inflamatorio, neuropático (Barragán-Iglesias et al., 2016; Inoue y Tsuda, 2009; Suter et al., 2007; Tsuda et al., 2013, 2003) y funcional (Orellana et al., 2015; Puga et al., 2015). Se sabe que la microglía activada produce y libera citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, NGF, TNF- α) y factores neurotróficos (BDNF) que contribuyen al desarrollo de la sensibilización central, favoreciendo la hiperexcitabilidad neuronal (Ji et al., 2014; Kawasaki et al., 2008). El BDNF secretado de la microglía promueve la reducción de la expresión del co-transportador KCC2 induciendo la acumulación del Cl⁻ intracelular en neuronas de proyección (De Koninck, 2007; Zhang et al., 2013) y, por lo tanto, la inhibición GABAérgica post-sináptica disminuye (Coull et al., 2005). Con estos datos, es posible especular que la pérdida de la desinhibición GABAérgica pre y post-sináptica junto con la pérdida de la inhibición tónica mediada por los receptores GABA_A- α 5 (De la luz-Cuellar, 2018) podrían conducir al mantenimiento de las conductas nociceptivas en el modelo de fibromialgia inducido por reserpina.

11. Conclusión

Los co-transportadores NKCC1 y KCC2 participan en el mantenimiento y establecimiento de la hipersensibilidad nociceptiva en la fibromialgia inducida por reserpina en ratas.

12. Perspectivas

Después del análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, se hace evidente la necesidad de plantearnos las siguientes perspectivas:

1. Debido a los cambios encontrados en la expresión de las proteínas NKCC1 y KCC2, es importante determinar mediante q-PCR cambios en los niveles del ARNm de dichas proteínas en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina.
2. Es de interés evaluar cambios en la expresión y distribución del receptor TrkB en el asta dorsal de la médula espinal mediante *Western blot* e inmunohistoquímica. Además, determinar los niveles tisulares de BDNF mediante ELISA con el propósito de sugerir la participación de la vía TrkB-BDNF-KCC2 en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina.
3. Estudiar si el dolor funcional es capaz de producir cambios en los niveles de metilación en el promotor de los genes Slc12a2 (NKCC1) y Slc12a5 (KCC2) mediante pirosecuenciación y PCR sensible a metilación. Evaluar los niveles de metilación y acetilación de las histonas en el promotor de los dichos genes mediante inmunoprecipitación de la cromatina.
4. Por último, datos recientes de nuestro laboratorio han demostrado cambios en la función de los receptores extrasinápticos GABA_A α_5 en el modelo de fibromialgia inducida por reserpina. Es interesante evaluar mediante herramientas farmacológicas, moleculares y electrofisiológicas la posible participación de los receptores extrasinápticos GABA_A α_6 en el control de la hipersensibilidad nociceptiva inducida por reserpina.

13. Referencias

- Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Mishina, M., Nakai, Y., Ito, S. (2005). Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, 22(6), 1445–1454.
- Abeles, M., Solitar, B. M., Pillinger, M. H., Abeles, A. M. (2008). Update on fibromyalgia therapy. *The American Journal of Medicine*, 121(7), 555–561.
- Ablin, J. N., Buskila, D. (2015). Update on the genetics of the fibromyalgia syndrome. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 29(1), 20–28.
- Ablin, J., Neumann, L., Buskila, D. (2008). Pathogenesis of fibromyalgia - A review. *Joint Bone Spine*, 75(3), 273–279.
- Ahmed, M. M., Lee, H., Clark, Z., Miranpuri, G. S., Nacht, C., Patel, K., Liu, L., Joslin, J., Kintner, D., Resnick, D. K. (2014). Pathogenesis of spinal cord injury induced edema and neuropathic pain: Expression of multiple isoforms of wnk1. *Annals of Neurosciences*, 21(3), 97–103.
- Akkuş, S., Naziroğlu, M., Eriş, S., Yalman, K., Yılmaz, N., Yener, M. (2009). Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. *Cell Biochemistry and Function*, 27(4), 181–5.
- Almeida, T. F., Roizenblatt, S., Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000(1), 40–56.
- Álvarez-Leefmans, F.J. (2009). Chloride transporters in presynaptic inhibition, pain and neurogenic inflammation. En Álvarez-Leefmans F. J., Delpire E. (eds). *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System: From Molecules to Diseases*. Primera Edición, Elsevier Academic Press, pp. 439-470.
- Álvarez-Leefmans, F. J., Gamiño, S. M., Giraldez, F., Noguerón, I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *The Journal of Physiology*, 406, 225–46.
- Álvarez-Leefmans, F. J., León-Olea, M., Mendoza-Sotelo, J., Álvarez, F. J., Antón, B., Garduo, R. (2001). Immunolocalization of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*, 104(2), 569–582.

-
- Álvarez, P., Green, P. G., Levine, J. D. (2014). Role for monocyte chemoattractant protein-1 in the induction of chronic muscle pain in the rat. *Pain*, 155(6), 1161–7.
- Anderson, S. D., Basbaum, A. I., Fields, H. L. (1977). Response of medullary raphe neurons to peripheral stimulation and to systemic opiates. *Brain Research*, 123(2), 363–8.
- Andres, C., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Elias-Viñas, D., Felix, R., Delgado-Lezama, R. (2014). Extrasynaptic $\alpha 6$ subunit-containing GABA_A receptors modulate excitability in turtle spinal motoneurons. *PLoS ONE*, 9(12), e115378.
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*, 9, 463–484.
- Arora, V., Chopra, K. (2013). Possible involvement of oxido-nitrosative stress induced neuro-inflammatory cascade and monoaminergic pathway: Underpinning the correlation between nociceptive and depressive behaviour in a rodent model. *Journal of Affective Disorders*, 151(3), 1041–1052.
- Arora, V., Kuhad, A., Tiwari, V., Chopra, K. (2011). Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinology*, 36(10), 1570–81.
- Ataka, T., Gu, J. (2006). Relationship between tonic inhibitory currents and phasic inhibitory activity in the spinal cord lamina II region of adult mice. *Molecular Pain*, 2(1), 36.
- Baraniuk, J. N., Whalen, G., Cunningham, J., Clauw, D. J. (2004). Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 5(1), 48.
- Bardoni, R., Takazawa, T., Tong, C. K., Choudhury, P., Scherrer, G., Macdermott, A. B. (2013). Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1279(1), 90–96.
- Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J. B., Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Price, T. J., Murbartián, J., Granados-Soto, V. (2016). Predominant role of spinal P2Y₁ receptors in the development of neuropathic pain in rats. *Brain Research*, 1636, 43–51.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–284.

-
- Ben-ari, Y. (2007). Un transmetteur pionnier pour la construction du cerveau. *Medicine Sciences*, 23, 751–755.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 728–739.
- Bennett, R. M., Schein, J., Kosinski, M. R., Hewitt, D. J., Jordan, D. M., Rosenthal, N. R. (2005). Impact of fibromyalgia pain on health-related quality of life before and after treatment with tramadol/acetaminophen. *Arthritis and Rheumatism*, 53(4), 519–27.
- Berry, P. H., Katz, J. A., Chapman, R., Miaskowski, C., Covington, E., McLean, M., Dahl, J. L. (2001). Pain: current understanding of assessment, management, and treatments (1st ed.). USA: National pharmaceutical council, Inc.
- Blasco-Serra, A., Escrihuela-Vidal, F., González-Soler, E. M., Martínez-Expósito, F., Blasco-Ausina, M. C., Martínez-Bellver, S., Cervera-Ferri, A., Teruel-Martí, V., Valverde-Navarro, A. A. (2015). Depressive-like symptoms in a reserpine-induced model of fibromyalgia in rats. *Physiology and Behavior*, 151, 456–462.
- Bonin, R. P., De Koninck, Y. (2013). Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neuroscience Letters*, 557, 43–51.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Pineda-Farias, J. B., Barragán-Iglesias, P., López-Sánchez, P., Granados-Soto, V. (2012). Role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors in development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(2), 246–257.
- Brodin, E., Ernberg, M., Olgart, L. (2016). Neurobiology: General considerations-acute to chronic pain. *Den Norske Tannlegeforenings Tidende*, 126, 28–33.
- Burt, D. R., Kamatchi, G. L. (1991). GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB Journal*, 5(14), 2916–23.
- Buskila, D., Press, J., Gedalia, A., Klein, M., Neumann, L., Boehm, R., Sukenik, S. (1993). Assessment of nonarticular tenderness and prevalence of fibromyalgia in children. *The Journal of Rheumatology*, 20(2), 368–70.
- Cao, Y., Li, Q. (2017). The variation of the 5-hydroxytryptamine system between

- chronic unpredictable mild stress rats and chronic fatigue syndrome rats induced by forced treadmill running. *NeuroReport*, 28(11), 630–637.
- Caro, X. J., Winter, E. F. (2014). Evidence of abnormal epidermal nerve fiber density in fibromyalgia: clinical and immunologic implications. *Arthritis and Rheumatology*, 66(7), 1945–54.
- Castro, A., Li, Y., Raver, C., Chandra, R., Masri, R., Lobo, M. K. (2017). Neuropathic pain after chronic nerve constriction may not correlate with chloride dysregulation in mouse trigeminal nucleus caudalis neurons. *Pain*, 158, 1366–1372.
- Cervantes-Durán, C., Pineda-Farias, J. B., Bravo-Hernández, M., Quiñonez-Bastidas, G. N., Vidal-Cantú, G. C., Barragán-Iglesias, P., Granados-Soto, V. (2013). Evidence for the participation of peripheral 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, and 5-HT_{2C} receptors in formalin-induced secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Neuroscience*, 232, 169–181.
- Cervero, F., Laird, J. M. A. (1996). Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, 68(1), 13-23.
- Cervero, F., Laird, J. M., García-Nicas, E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: An update. *European Journal of Pain*, 7(4), 345–351.
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63.
- Chen, J. T., Guo, D., Campanelli, D., Frattini, F., Mayer, F., Zhou, L., Kuner, R., Heppenstall, P. A., Knipper, M., Hu, J. (2014). Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. *Nature Communications*, 5, 5331.
- Chen, S. R., Zhu, L., Chen, H., Wen, L., Laumet, G., Pan, H. L. (2014). Increased spinal cord Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter-1 (NKCC1) activity contributes to impairment of synaptic inhibition in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31111–31120.
- Chen, W.-N., Lee, C.-H., Lin, S.-H., Wong, C.-W., Sun, W.-H., Wood, J. N., Chen, C.-C. (2014). Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Molecular Pain*, 10, 40.
- Cheng, S.-J., Chen, C.-C., Yang, H.-W., Chang, Y.-T., Bai, S.-W., Chen, C.-C., Yen, C.-T., Min, M.-Y. (2011). Role of extracellular signal-regulated kinase in synaptic

- transmission and plasticity of a nociceptive input on capsular central amygdaloid neurons in normal and acid-induced muscle pain mice. *Journal of Neuroscience*, 31(6), 2258–70.
- Ciampi de Andrade, D., Maschietto, M., Galhardoni, R., Gouveia, G., Chile, T., Victorino Krepischi, A. C., Dale, C. S., Brunoni, A. R., Parravano, D. C., Cueva Moscoso, A. S., Raicher, I., Kaziyama, H. H. S., Teixeira, M. J., Brentani, H. P. (2017). Epigenetics insights into chronic pain: DNA hypomethylation in fibromyalgia-a controlled pilot-study. *Pain*, 158(8), 1473–1480.
- Clark, A. K., Old, E. A., Malcangio, M. (2013). Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *Journal of Pain Research*, 6, 803–14.
- Clauw, D. J. (2014). Fibromyalgia. *Clinical Review and Education*, 311(15), 1547.
- Clauw, D. J., Arnold, L. M., McCarberg, B. H. (2011). The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(9), 907–911.
- Cook, D. B., Lange, G., Ciccone, D. S., Liu, W.-C., Steffener, J., Natelson, B. H. (2004). Functional imaging of pain in patients with primary fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 31(2), 364–78.
- Cordero, M. D., Alcocer-Gómez, E., Culic, O., Carrión, A. M., de Miguel, M., Díaz-Parrado, E., Pérez-Villegas, E. M., Bullón, P., Battino, M., Sánchez-Alcazar, J. A. (2014). NLRP3 inflammasome is activated in fibromyalgia: the effect of coenzyme Q10. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(8), 1169–1180.
- Cordero, M. D., Cotán, D., del-Pozo-Martín, Y., Carrión, A. M., de Miguel, M., Bullón, P., Sánchez-Alcazar, J. A. (2012). Oral coenzyme Q10 supplementation improves clinical symptoms and recovers pathologic alterations in blood mononuclear cells in a fibromyalgia patient. *Nutrition*, 28(11–12), 1200–3.
- Corrigan, R., Derry, S., Wiffen, P. J., Moore, R. A. (2012). Clonazepam for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5), CD009486.
- Costigan, M., Woolf, C. J. (2000). Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, 1(3), 35–44.
- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), 1017–1021.

- Coull, J., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sík, A., De Koninck, P., De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951), 938–942.
- Covarrubias-Gómez, A., Carrillo-Torres, O. (2016). Actualidades conceptuales sobre fibromialgia. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 39(1), 58–63.
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Guitiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J. A., Córdova-Domínguez, J. A. (2010). Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 33(4), 207–213.
- Cramer, S. W., Baggott, C., Cain, J., Tilghman, J., Allcock, B., Miranpuri, G., Rajpal, S., Sun, D., Resnick, D. (2008). The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Molecular Pain*, 4, 1744-8069-4–36.
- Curiel-Gómez, E. (2018). Participación del co-transportador KCC2 en un modelo de dolor inducido por estrés crónico en ratas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados I.P.N.
- De Koninck, Y. (2007). Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 93–99.
- De la luz-Cuellar, Y. (2018). *Participación de los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ en un modelo de fibromialgia en ratas*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados I.P.N.
- de Souza, A. H., da Costa Lopes, A. M., Castro, C. J., Pereira, E. M. R., Klein, C. P., da Silva, C. A., da Silva, J. F., Ferreira, J., Gómez, M. V. (2014). The effects of Ph α 1 β , a spider toxin, calcium channel blocker, in a mouse fibromyalgia model. *Toxicon*, 81, 37–42.
- Delpire, E., Austin, T. M. (2010). Kinase regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in primary afferent neurons. *The Journal of Physiology*, 588(18), 3365–3373.
- Delpire, E., Days, E., Lewis, L. M., Mi, D., Kim, K., Lindsley, C. W., Weaver, C. D. (2009). Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), 5383–5388.
- DeSantana, J. M., da Cruz, K. M., Sluka, K. A. (2013). Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Research and Therapy*, 15(6), 222.
- Diatchenko, L., Slade, G. D., Nackley, A. G., Bhalang, K., Sigurdsson, A., Belfer, I.,

- Goldman, D., Xu, K., Shabalina, S. A., Shagin, D., Max, M. B., Makarov, S. S., Maixner, W. (2005). Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Human Molecular Genetics*, 14(1), 135–143.
- Dina, O. A., Green, P. G., Levine, J. D. (2008). Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*, 152(2), 521–5.
- Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20, 441–62.
- Doppler, K., Rittner, H. L., Deckart, M., Sommer, C. (2015). Reduced dermal nerve fiber diameter in skin biopsies of patients with fibromyalgia. *Pain*, 156(11), 2319–25.
- Doyon, N., Prescott, S. A., Castonguay, A., Godin, A. G., Kröger, H., De Koninck, Y. (2011). Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLoS Computational Biology*, 7(9).
- Eccleston, D. (1982). The biochemistry of affective disorders. *British Journal of Hospital Medicine*, 27(6), 627–30.
- Erickson, J. D., Eiden, L. E., Hoffman, B. J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10993–7.
- Fairbanks, C. A., Goracke-Postle, C. J. (2015). Neurobiological studies of chronic pain and analgesia: rationale and refinements. *European Journal of Pharmacology*, 759, 169–181.
- Farrant, M., Kaila, K. (2007). The cellular, molecular and ionic basis of GABA_A receptor signalling. *Progress in brain research* (Vol. 160, pp. 59–87).
- Farrant, M., Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 215–229.
- Favero, G., Trapletti, V., Bonomini, F., Stacchiotti, A., Lavazza, A., Rodella, L. F., Rezzani, R. (2017). Oral supplementation of melatonin protects against fibromyalgia-related skeletal muscle alterations in reserpine-induced myalgia rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7).
- Ferrari, L. F., Lotufo, C. M., Araldi, D., Rodrigues, M. A., Macedo, L. P., Ferreira, S. H., Parada, C. A. (2014). Inflammatory sensitization of nociceptors depends on

- activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), 18363–18368.
- Ferrini, F., Lorenzo, L.-E., Godin, A. G., Quang, M. Le, De Koninck, Y. (2017). Enhancing KCC2 function counteracts morphine-induced hyperalgesia. *Scientific Reports*, 7(1), 3870.
- Fields, H. L., Anderson, S. D., Clanton, C. H., Basbaum, A. I. (1976). Nucleus raphe magnus: a common mediator of opiate- and stimulus-produced analgesia. *Transactions of the American Neurological Association*, 101, 208–10.
- Fields, H. L., Basbaum, A. I., Clanton, C. H., Anderson, S. D. (1977). Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Research*, 126(3), 441–53.
- Fiz, J., Durán, M., Capellà, D., Carbonell, J., Farré, M. (2011). Cannabis use in patients with fibromyalgia: effect on symptoms relief and health-related quality of life. *PloS One*, 6(4), e18440.
- Gagnon, M., Bergeron, M. J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R. P., Pérez-Sánchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., Valade, I., Bachand, K., Jacob-Wagner, M., Tardif, C., Kianicka, I., Isenring, P., Attardo, G., ... De Koninck, Y. (2013). Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nature Medicine*, 19(11), 1524–8.
- Galan, A., Cervero, F. (2005). Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience*, 133(1), 245–252.
- Gandhi, R., Ryals, J. M., Wright, D. E. (2004). Neurotrophin-3 reverses chronic mechanical hyperalgesia induced by intramuscular acid injection. *The Journal of Neuroscience*, 24(42), 9405–13.
- Gao, Y., Zhou, J. J., Zhu, Y., Kosten, T., Li, D. P. (2016). Chronic unpredictable mild stress induces loss of GABA inhibition in corticotrophin-releasing hormone-expressing neurons through NKCC1 upregulation. *Neuroendocrinology*, 194–208.
- García-Nicas, E., Laird, J. M. A., Cervero, F. (2006). GABA_A receptor blockade reverses the injury-induced sensitization of nociceptor-specific (NS) neurons in the spinal dorsal horn of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 661-670.
- Geenen, R., Jacobs, J. W. G., Bijlsma, J. W. J. (2002). Evaluation and management

- of endocrine dysfunction in fibromyalgia. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 28(2), 389–404.
- Geisser, M. E., Glass, J. M., Rajcevska, L. D., Clauw, D. J., Williams, D. A., Kileny, P. R., Gracely, R. H. (2008). A psychophysical study of auditory and pressure sensitivity in patients with fibromyalgia and healthy controls. *The Journal of Pain*, 9(5), 417–22.
- Godínez-Chaparro, B., López-Santillán, F. J., Orduña, P., Granados-Soto, V. (2012). Secondary mechanical allodynia and hyperalgesia depend on descending facilitation mediated by spinal 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. *Neuroscience*, 222, 379–91.
- Goldberg, D. S., McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11, 770.
- Gracely, R. H., Petzke, F., Wolf, J. M., Clauw, D. J. (2002). Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 46(5), 1333–1343.
- Graeff, F. G., Guimarães, F. S., De Andrade, T. G., Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 54(1), 129–41.
- Granados-Soto, V., Arguelles, C. F., Álvarez-Leefmans, F. J. (2005). Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. *Pain*, 114(1–2), 231–238.
- Granero, G.E., Longhi, M.R., Mora, M.J., Junginger, H.E., Midha, K.K., Shah, V.P., Stavchansky, S., Dressman, J.B., Barends, D.M. (2009). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 2544-2556.
- Graven-Nielsen, T., Aspegren Kendall, S., Henriksson, K. G., Bengtsson, M., Sörensen, J., Johnson, A., Gerdle, B., Arendt-Nielsen, L. (2000). Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain*, 85(3), 483–91.
- Green, P. G., Álvarez, P., Gear, R. W., Mendoza, D., Levine, J. D. (2011). Further validation of a model of fibromyalgia syndrome in the rat. *The Journal of Pain*, 12(7), 811–818.
- Gregory, N. S., Gibson-Corley, K., Frey-Law, L., Sluka, K. A. (2013). Fatigue-

- enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*, 154(12), 2668–76.
- Guan, Z., Kuhn, J.A., Wang, X., Colquitt, B., Solorzano, C., Vaman, S., Guan, A.K., Evans-Reinsch, Z., Braz, J., Devor, M., Abboud-Werner, S.L., Lainer, L.L., Lomvardas, S., Basbaum, A.L. (2016). Injured sensory neuron-derived CSF-1 induces microglia proliferation and DAP12-dependent pain. *Nature Neuroscience*, 19(1), 94-101.
- Guo, D., Hu, J. (2014). Spinal presynaptic inhibition in pain control. *Neuroscience*, 283, 95–106.
- Hald, A. (2009). Spinal astrogliosis in pain models: Cause and effects. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(5), 609–619.
- Harris, R. E. (2010). Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. *Arthritis Research and Therapy*, 12(5), 141.
- Harris, R. E., Clauw, D. J., Scott, D. J., McLean, S. A., Gracely, R. H., Zubieta, J. K. (2007). Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of Neuroscience*, 27(37), 10000–6.
- Harris, R. E., Napadow, V., Huggins, J. P., Pauer, L., Kim, J., Hampson, J., Sundgren, P. C., Foerster, B., Petrou, M., Schmidt-Wilcke, T., Clauw, D. J. (2013). Pregabalin rectifies aberrant brain chemistry, connectivity, and functional response in chronic pain patients. *Anesthesiology*, 119(6), 1453–1464.
- Harris, R. E., Sundgren, P. C., Craig, A. D., Kirshenbaum, E., Sen, A., Napadow, V., Clauw, D. J. (2009). Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. *Arthritis and Rheumatism*, 60(10), 3146–52.
- Hasbargen, T., Ahmed, M. M., Miranpuri, G., Li, L., Kahle, K. T., Resnick, D., Sun, D. (2010). Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1198, 168–172.
- He, Y., Xu, S., Huang, J., Gong, Q. (2014). Analgesic effect of intrathecal bumetanide is accompanied by changes in spinal sodium-potassium-chloride co-transporter 1 and potassium-chloride co-transporter 2 expression in a rat model of incisional pain. *Neural Regeneration Research*, 9(10), 1055–1062.
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*,

- 60(1), 214–25.
- Hernández-León, A., De la Luz-Cuellar, Y., Granados-Soto, V., González-Trujano, M., Fernández-Guasti, A. (2018). Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. *Hormones and Behavior*, 97(9), 39–46.
- Hildebrand, M. E., Xu, J., Dedek, A., Li, Y., Sengar, A. S., Beggs, S., Lombroso, P. J., Salter, M. W. (2016). Potentiation of synaptic GluN2B NMDAR currents by Fyn kinase is gated through BDNF-mediated disinhibition in spinal pain processing. *Cell Reports*, 17(10), 2753–2765.
- Hoeger-Bement, M. K., Sluka, K. A. (2003). Phosphorylation of CREB and mechanical hyperalgesia is reversed by blockade of the cAMP pathway in a time-dependent manner after repeated intramuscular acid injections. *The Journal of Neuroscience*, 23(13), 5437–45.
- Hoheisel, U., Reinöhl, J., Unger, T., Mense, S. (2004). Acidic pH and capsaicin activate mechanosensitive group IV muscle receptors in the rat. *Pain*, 110(1), 149–157.
- Holton, K. F., Taren, D. L., Thomson, C. A., Bennett, R. M., Jones, K. D. (2012). The effect of dietary glutamate on fibromyalgia and irritable bowel symptoms. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30(6), 10–7.
- Hori, K., Ozaki, N., Suzuki, S., Sugiura, Y. (2010). Upregulations of P2X3 and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain*, 149(2), 393–405.
- Hossaini, M., Goos, J. A. C., Kohli, S. K., Holstege, J. C. (2012). Distribution of glycine/GABA neurons in the ventromedial medulla with descending spinal projections and evidence for an ascending glycine/GABA projection. *PloS One*, 7(4), e35293.
- Huang, Y. J., Lee, K. H., Murphy, L., Garraway, S. M., Grau, J. W. (2016). Acute spinal cord injury (SCI) transforms how GABA affects nociceptive sensitization. *Experimental Neurology*, 285(Pt A), 82–95.
- Hunt, S. P., Mantyh, P. W. (2001). The molecular dynamics of control pain control. *Neuroscience*, 2(February), 7–8.
- Immke, D. C., McCleskey, E. W. (2001). Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nature Neuroscience*, 4(9), 869–870.

-
- Inoue, K., Tsuda, M. (2009). Microglia and neuropathic pain. *Glia*, 57(14), 1469–1479.
- Ji, K., Miyauchi, J., Tsirka, S. E. (2013). Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plasticity*, 2013, 1–9.
- Ji, R.-R., Berta, T., Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154, S10–S28.
- Ji, R.-R., Xu, Z.-Z., Gao, Y.-J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), 533–548.
- Jolival, C. G., Lee, C. A., Ramos, K. M., Calcutt, N. A. (2008). Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain*, 140(1), 48–57.
- Jones, K. D., Deodhar, P., Lorentzen, A., Bennett, R. M., Deodhar, A. A. (2007). Growth hormone perturbations in fibromyalgia: a review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 36(6), 357–379.
- Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P., Marchand, S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, 114(1–2), 295–302.
- Kahle, K. T., Staley, K. J., Nahed, B. V, Gamba, G., Hebert, S. C., Lifton, R. P., Mount, D. B. (2008). Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 4(9), 490–503.
- Kaneko, K., Umehara, M., Homan, T., Okamoto, K., Oka, M., Oyama, T. (2014). The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 562, 28–33.
- Kato, G., Yasaka, T., Katafuchi, T., Furue, H., Mizuno, M., Iwamoto, Y., Yoshimura, M. (2006). Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1787–94.
- Katz, N. (2002). The impact of pain management on quality of life. *Journal of Pain and Symptom Management*, 24(1), 38–47.
- Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.K., Ji, R.R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 28(20), 5189–94.
- Keller, A. F., Beggs, S., Salter, M. W., De Koninck, Y. (2007). Transformation of the

- output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain*, 3, 1744-8069-3–27.
- Khasar, S. G., Burckham, J., Dina, O. A., Brown, A. S., Bogen, O., Alessandri-Haber, N., Green, P. G., Reichling, D. B., Levine, J. D. (2008). Stress induces a switch of intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *The Journal of Neuroscience*, 28(22), 5721–30.
- Khasar, S. G., Dina, O. A., Green, P. G., Levine, J. D. (2009). Sound stress-induced long-term enhancement of mechanical hyperalgesia in rats is maintained by sympathoadrenal catecholamines. *The Journal of Pain*, 10(10), 1073–7.
- Kim, M. J., Park, Y. H., Yang, K. Y., Ju, J. S., Bae, Y. C., Han, S. K., Ahn, D. K. (2017). Participation of central GABA_A receptors in the trigeminal processing of mechanical allodynia in rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 21(1), 65–74.
- Kim, J.Y. V, Tillu, D. V, Quinn, T. L., Mejia, G. L., Shy, A., Asiedu, M. N. K., Murad, E., Schumann, A. P., Totsch, S. K., Sorge, R. E., Mantyh, P. W., Dussor, G., Price, T. J. (2015). Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism. *The Journal of Neuroscience*, 35(16), 6307–17.
- Kiso, T., Moriyama, A., Furutani, M., Matsuda, R., Funatsu, Y. (2018). Effects of pregabalin and duloxetine on neurotransmitters in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of fibromyalgia. *European Journal of Pharmacology*, 827, 117–124.
- Kitayama, T. (2017). The role of K⁺-Cl⁻ cotransporter-2 in neuropathic pain. *Neurochemical Research*, 0(0), 1–6.
- Kitayama, T., Morita, K., Motoyama, N., Dohi, T. (2016). Down-regulation of zinc transporter-1 in astrocytes induces neuropathic pain via the brain-derived neurotrophic factor K⁺-Cl⁻ co-transporter-2 signaling pathway in the mouse spinal cord. *Neurochemistry International*, 101, 120–131.
- Klein, C. P., Sperotto, N. D. M., Maciel, I. S., Leite, C. E., Souza, A. H., Campos, M. M. (2014). Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. *Neuropharmacology*, 86, 57–66.
- Kosek, E., Altawil, R., Kadetoff, D., Finn, A., Westman, M., Le Maître, E., Andersson, M., Jensen-Urstad, M., Lampa, J. (2015). Evidence of different mediators of

- central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain--interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1 β in rheumatoid arthritis. *Journal of Neuroimmunology*, 280, 49–55.
- Kramer H.J. (1990). Diuretics. En Ganten, D., Mulrow, P.J. (eds). *Pharmacology of Anti-hypertensive Therapeutics*. Primera edición, Springer-Verlag, pp 22-56.
- Kramer, P. R., Bellinger, L. L. (2013). Reduced GABA_A receptor $\alpha 6$ expression in the trigeminal ganglion enhanced myofascial nociceptive response. *Neuroscience*, 245, 1–11.
- Kulkarni, S. K. (1980). Heat and other physiological stress-induced analgesia: catecholamine mediated and naloxone reversible response. *Life Sciences*, 27(3), 185–8.
- Kulkarni, S. K., Robert, R. K. (1982). Reversal by serotonergic agents of reserpine-induced hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 83(3–4), 325–8.
- Lagraize, S. C., Guo, W., Yang, K., Wei, F., Ren, K., Dubner, R. (2010). Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, 171(4), 1341–56.
- Laird, J. M., García-Nicas, E., Delpire, E. J., Cervero, F. (2004). Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride co-transporter in hyperalgesia. *Neuroscience Letters*, 361(1–3), 200–203.
- Larson, A. A., Giovengo, S. L., Russell, I. J., Michalek, J. E. (2000). Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. *Pain*, 87(2), 201–11.
- Latremoliere, A., Woolf, C. J. (2010). Central Sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9), 895–926.
- Li, Y. Q., Li, H., Wei, J., Qu, L., Wu, L. A. (2010). Expression changes of K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 and Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter 1 in mouse trigeminal subnucleus caudalis following pulpal inflammation. *Brain Research Bulletin*, 81(6), 561–564.
- Lin, C.C. J., Chen, W.N., Chen, C.J., Lin, Y.W., Zimmer, A., Chen, C.C. (2012). An antinociceptive role for substance P in acid-induced chronic muscle pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4781–4786.

- America*, 109(2), E76–E83.
- Lin, C.R., Cheng, J.K., Wu, C.H., Chen, K.H., Liu, C.K. (2017). Epigenetic suppression of potassium-chloride co-transporter 2 expression in inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant (CFA). *European Journal of Pain*, 21(2), 309–321.
- Lin, J.G., Hsieh, C.L., Lin, Y.W. (2015). Analgesic Effect of electroacupuncture in a mouse fibromyalgia model: Roles of TRPV1, TRPV4, and pERK. *PloS One*, 10(6), e0128037.
- Linhart, O., Obreja, O., Kress, M. (2003). The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E₂ and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 118(1), 69–74.
- Liu, Y.T., Shao, Y.W., Yen, C.T., Shaw, F.Z. (2014). Acid-induced hyperalgesia and anxi-depressive comorbidity in rats. *Physiology and Behavior*, 131, 105–10.
- Loeser, J. D., Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*, 137(3), 473–477.
- Loeza-Alcocer, E., Canto-Bustos, M., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Felix, R., Delgado-Lezama, R. (2013). $\alpha 5$ GABA_A receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 110, 2175–2184.
- López-Solà, M., Woo, C.-W., Pujol, J., Deus, J., Harrison, B. J., Monfort, J., Wager, T. D. (2017). Towards a neurophysiological signature for fibromyalgia. *Pain*, 158(1), 34–47.
- Ma, W., Chabot, J.-G., Vercauteren, F., Quirion, R. (2010). Injured nerve-derived COX2/PGE₂ contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 31(7), 1227–1237.
- Macfarlane, G. J. (1999). Regional pain: an epidemiological view. *Bailliere's Clinical Rheumatology*, 13(3), 403–414.
- Mandela, P., Chandley, M., Xu, Y.-Y., Zhu, M.-Y., Ordway, G. A. (2010). Reserpine-induced reduction in norepinephrine transporter function requires catecholamine storage vesicles. *Neurochemistry International*, 56(6–7), 760–7.
- Marques, A. P., De sousa do Espírito Santo, A., Assumpção-Berssaneti, A. A., Matsutani, L. A., Yuan, S. L. (2017). A prevalência de fibromialgia: atualização da revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 57(4), 356–363.
- Melzack, R., Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 3699.

- Mendieta, D., De la Cruz-Aguilera, D. L., Barrera-Villalpando, M. I., Becerril-Villanueva, E., Arreola, R., Hernández-Ferreira, E., Pérez-Tapia, S. M., Pérez-Sánchez, G., Garcés-Alvarez, M. E., Aguirre-Cruz, L., Velasco-Velázquez, M. A., Pavón, L. (2016). IL-8 and IL-6 primarily mediate the inflammatory response in fibromyalgia patients. *Journal of Neuroimmunology*, 290, 22–5.
- Merskey, H., Bogduk, N. (1986). Classification of chronic pain. *Pain*.
- Miletic, G., Draganic, P., Pankratz, M. T., Miletic, V. (2003). Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1. *Pain*, 105(1–2), 347–53.
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474.
- Mizumura, K. (2009). Peripheral mechanism of muscle pain: an update. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 20(4), 183–187.
- Moalem, G., Xu, K., Yu, L. (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*, 129(3), 767–777.
- Mòdol, L., Cobianchi, S., Navarro, X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 155(8), 1577–1590.
- Morales-Aza, B. M., Chillingworth, N. L., Payne, J. A., Donaldson, L. F. (2004). Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiology of Disease*, 17(1), 62–69.
- Müller, F., Heinke, B., Sandkühler, J. (2003). Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience*, 122(3), 799–805.
- Murai, N., Fushiki, H., Honda, S., Murakami, Y., Iwashita, A., Irie, M., Tamura, S., Nagakura, Y., Aoki, T. (2015). Relationship between serotonin transporter occupancies and analgesic effects of AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, and duloxetine in reserpine-induced myalgia rats. *Neuroscience*, 289, 262–269.
- Murphy, K. L., Zhang, X., Gainetdinov, R. R., Beaulieu, J.-M., Caron, M. G. (2008). A regulatory domain in the N terminus of tryptophan hydroxylase 2 controls enzyme expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13216–24.
- Nackley, A. G., Tan, K. S., Fecho, K., Flood, P., Diatchenko, L., Maixner, W. (2007).

- Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both β_2 - and β_3 -adrenergic receptors. *Pain*, 128(3), 199–208.
- Nagakura, Y., Oe, T., Aoki, T., Matsuoka, N. (2009). Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: a putative animal model of fibromyalgia. *Pain*, 146(1–2), 26–33.
- Nagakura, Y., Takahashi, M., Noto, T., Sekizawa, T., Oe, T., Yoshimi, E., Tamaki, K., Shimizu, Y. (2012). Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 242–249.
- Nazeri, M., Zarei, M.-R., Pourzare, A.-R., Ghahrehab-Chahi, H.-R., Abareghi, F., Shabani, M. (2018). Evidence of altered trigeminal nociception in an animal model of fibromyalgia. *Pain Medicine*, 19(2), 328–335.
- Neeck, G. (2000). Neuroendocrine and hormonal perturbations and relations to the serotonergic system in fibromyalgia patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement*, 113, 8–12.
- Nishiyori, M., Nagai, J., Nakazawa, T., Ueda, H. (2010). Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 472(3), 184–187.
- Nishiyori, M., Ueda, H. (2008). Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Molecular Pain*, 4, 52.
- Norberg, J. K., Sells, E., Chang, H.-H., Alla, S. R., Zhang, S., Meuillet, E. J. (2013). Targeting inflammation: multiple innovative ways to reduce prostaglandin E₂. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 2(2), 265–88.
- Oaklander, A. L., Herzog, Z. D., Downs, H. M., Klein, M. M. (2013). Objective evidence that small-fiber polyneuropathy underlies some illnesses currently labeled as fibromyalgia. *Pain*, 154(11), 2310–2316.
- Oe, T., Tsukamoto, M., Nagakura, Y. (2010). Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. *Neuroscience*, 169(4), 1860–1871.
- Ogino, S., Nagakura, Y., Tsukamoto, M., Watabiki, T., Ozawa, T., Oe, T., Shimizu, Y., Ito, H. (2013). Systemic administration of 5-HT_{2C} receptor agonists attenuates muscular hyperalgesia in reserpine-induced myalgia model. *Pharmacology*,

-
- Biochemistry, and Behavior*, 108, 8–15.
- Oktayoglu, P., Tahtasiz, M., Bozkurt, M., Em, S., Ucar, D., Yazmalar, L., Mete, N., Nas, K., Gezer, O. (2013). Serum levels of high mobility group box 1 protein and its association with quality of life and psychological and functional status in patients with fibromyalgia. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 16(4), 403–7.
- Orellana, J. A., Moraga-Amaro, R., Díaz-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C. J., Stehberg, J., Sáez, J. C. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 102.
- Ossipov, M., Dussor, G., Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3779–87.
- Ossipov, M. H., Morimura, K., Porreca, F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 8(2), 143–51.
- Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 199–206.
- Peres Klein, C., Rodrigues Cintra, M., Binda, N., Montijo Diniz, D., Gómez, M. V., Souto, A. A., de Souza, A. H. (2016). Coadministration of resveratrol and rice oil mitigates nociception and oxidative state in a mouse fibromyalgia-like model. *Pain Research and Treatment*, 2016, 3191638.
- Pertovaara, A., Almeida, A. (2006). Chapter 13 Descending inhibitory systems. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 81, pp. 179–192). Elsevier.
- Petzke, F., Clauw, D. J., Ambrose, K., Khine, A., Gracely, R. H. (2003). Increased pain sensitivity in fibromyalgia: effects of stimulus type and mode of presentation. *Pain*, 105(3), 403–13.
- Pitcher, M. H., Cervero, F. (2010). Role of the NKCC1 co-transporter in sensitization of spinal nociceptive neurons. *Pain*, 151(3), 756–762.
- Prescott, S. A. (2015). Synaptic inhibition and disinhibition in the spinal dorsal horn. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 131). Elsevier Inc.
- Prescott, S. A., Sejnowski, T. J., De Koninck, Y. (2006). Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons:

- towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Molecular Pain*, 2, 32.
- Price, T. J., Cervero, F., De Koninck, Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(6), 547–555.
- Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., Prescott, A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews*, 60(1), 149–170.
- Price, T. J., Hargreaves, K. M., Cervero, F. (2006). Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Research*, 1112(1), 146–158.
- Price, T. J., Prescott, S. A. (2015). Inhibitory regulation of pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*, 156(5), 789–792.
- Puga, D. A., Tovar, C. A., Guan, Z., Gensel, J. C., Lyman, M. S., McTigue, D. M., Popovich, P. G. (2015). Stress exacerbates neuron loss and microglia proliferation in a rat model of excitotoxic lower motor neuron injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 246–54.
- Queiroz, L. P. (2013). Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 17(8), 356.
- Quintero, L., Moreno, M., Avila, C., Arcaya, J., Maixner, W., Suarez-Roca, H. (2000). Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 67(3), 449–58.
- Ransohoff, R. M., Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 119–45.
- Rao, S. G., Gendreau, J. F., Kranzler, J. D. (2007). Understanding the fibromyalgia syndrome. *Psychopharmacology Bulletin*, 40(4), 24–67.
- Rocha-González H. I., Mao S., Álvarez-Leefmans F. J. (2008). Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. *Journal of Neurophysiology*, 100: 169-184.
- Rossini, M., Di Munno, O., Valentini, G., Bianchi, G., Biasi, G., Cacace, E., Malesci, D., La Montagna, G., Viapiana, O., Adami, S. (2007). Double-blind, multicenter trial comparing acetyl L-carnitine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25(2), 182–8.
- Russell, I. J., Orr, M. D., Littman, B., Vipraio, G. A., Alboukrek, D., Michalek, J. E., Lopez, Y., MacKillip, F. (1994). Elevated cerebrospinal fluid levels of substance

- P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, 37(11), 1593–601.
- Russell, I. J., Vaeroy, H., Javors, M., Nyberg, F. (1992). Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 35(5), 550–6.
- Russell, J. M. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological Reviews*, 80(1), 211–276.
- Salemi, S., Rethage, J., Wollina, U., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S., Sprott, H. (2003). Detection of interleukin 1 β , IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 30(1), 146–50.
- Sandín, B. (2005). El síndrome de fatiga crónica: características psicológicas y terapia cognitivo-conductual. *Revista de Psicopatología y Psicología Clínica*, 10(1), 85–94.
- Sarchielli, P., Di Filippo, M., Nardi, K., Calabresi, P. (2007). Sensitization, glutamate, and the link between migraine and fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 11(5), 343–51.
- Schwarz, M. J., Späth, M., Müller-Bardorff, H., Pongratz, D. E., Bondy, B., Ackenheil, M. (1999). Relationship of substance P, 5-hydroxyindole acetic acid and tryptophan in serum of fibromyalgia patients. *Neuroscience Letters*, 259(3), 196–8.
- Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., Silver, R. A. (2004). Tonicly active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 262–269.
- Sharif-Naeini, R., Basbaum, A. I. (2011). Targeting pain where it resides ... In the brain. *Science Translational Medicine*, 3(65), 65ps1.
- Sherry, D. D., McGuire, T., Mellins, E., Salmonson, K., Wallace, C. A., Nepom, B. (1991). Psychosomatic musculoskeletal pain in childhood: clinical and psychological analyses of 100 children. *Pediatrics*, 88(6), 1093–9.
- Sica, D.A., Muntendam, P., Myers, R.L., Maaten, J.M., Sale, M.E., de Boer, R.A. Pitt, B. (2018). subcutaneous furosemide in heart failure: pharmacokinetic characteristics of a newly buffered solution. *JACC: Basic to translational science*, 3(1), 25-34.
- Siqueira-Lima, P. S., Brito, R. G., Araújo-Filho, H. G., Santos, P. L., Lucchesi, A.,

- Araújo, A. A. S., Menezes, P. P., Scotti, L., Scotti, M. T., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Zengin, G., Aktumsek, A., Antonioli, A. R., Quintans-Júnior, L. J., Quintans, J. S. S. (2017). Anti-hyperalgesic effect of Lippia grata leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: complemented with a molecular docking and antioxidant screening. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *91*, 739–747.
- Skyba, D. A., Lisi, T. L., Sluka, K. A. (2005). Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain*, *119*(1–3), 142–9.
- Sluka, K. A. (2009). Is it possible to develop an animal model of fibromyalgia? *Pain*, *146*(1–2), 3–4.
- Sluka, K. A., Audette, K. M. (2006). Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Molecular Pain*, *2*, 13.
- Sluka, K. A., Clauw, D. J. (2016). Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience*, *338*, 114–129.
- Sluka, K. A., Kalra, A., Moore, S. A. (2001). Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle and Nerve*, *24*(1), 37–46.
- Sluka, K. A., Price, M. P., Breese, N. M., Stucky, C. L., Wemmie, J. A., Welsh, M. J. (2003). Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain*, *106*(3), 229–39.
- Sluka, K. A., Radhakrishnan, R., Benson, C. J., Eshcol, J. O., Price, M. P., Babinski, K., Audette, K. M., Yeomans, D. C., Wilson, S. P. (2007). ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain*, *129*(1), 102–112.
- Sluka, K. A., Rasmussen, L. A. (2010). Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle inflammation. *Pain*, *148*(2), 188–197.
- Sprott, H., Salemi, S., Gay, R. E., Bradley, L. A., Alarcón, G. S., Oh, S. J., Michel, B. A., Gay, S. (2004). Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibres. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *63*(3), 245–51.
- Stein, C., Clark, J. D., Oh, U., Vasko, M. R., Wilcox, G. L., Overland, A., Vanderah, T. W., Spencerg, R. H. (2009). Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain*

-
- Research Reviews*, 60(1), 90–113.
- Sung, K. W., Kirby, M., McDonald, M. P., Lovinger, D. M., Delpire, E. (2000). Abnormal GABA_A receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter null mice. *The Journal of Neuroscience*, 20(20), 7531–8.
- Suter, M. R., Wen, Y. R., Decosterd, I., Ji, R.-R. (2007). Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biology*, 3(3), 255–268.
- Suzuki, R., Dickenson, A. (2005). Spinal and supraspinal contributions to central sensitization in peripheral neuropathy. *NeuroSignals*, 14(4), 175–181.
- Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., Kiyama, H., Yamanaka, A., Mizumura, K. (2015). Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain*, 156(3), 415–427.
- Tamano, R., Ishida, M., Asaki, T., Hasegawa, M., Shinohara, S. (2016). Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neuroscience Letters*, 615, 78–82.
- Tang, D., Qian, A. H., Song, D. D., Ben, Q. W., Yao, W. Y., Sun, J., Li, W. G., Xu, T. L., Yuan, Y. Z. (2015). Role of the potassium chloride cotransporter isoform 2-mediated spinal chloride homeostasis in a rat model of visceral hypersensitivity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(9), G767–G778.
- Tillu, D. V., Hassler, S. N., Burgos-Vega, C. C., Quinn, T. L., Sorge, R. E., Dussor, G., Boitano, S., Vagner, J., Price, T. J. (2015). Protease-activated receptor 2 activation is sufficient to induce the transition to a chronic pain state. *Pain*, 156(5), 859–67.
- Tofferi, J. K., Jackson, J. L., O'Malley, P. G. (2004). Treatment of fibromyalgia with cyclobenzaprine: a meta-analysis. *Arthritis Care and Research*, 51(1), 9–13.
- Toyoda, H., Yamada, J., Ueno, S., Okabe, A., Kato, H., Sato, K., Hashimoto, K., Fukuda, A. (2005). Differential functional expression of cation-Cl⁻ cotransporter mRNAs (KCC1, KCC2, and NKCC1) in rat trigeminal nervous system. *Molecular Brain Research*, 133(1), 12–18.
- Tracey, I., Mantyh, P. W. (2007). The cerebral signature for pain perception and its

- modulation. *Neuron*, 55(3), 377–391.
- Truini, A., Tinelli, E., Gerardi, M. C., Calistri, V., Iannuccelli, C., La Cesa, S., Tarsitani, L., Mainero, C., Sarzi-Puttini, P., Cruccu, G., Caramia, F., Di Franco, M. (2016). Abnormal resting state functional connectivity of the periaqueductal grey in patients with fibromyalgia. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34(2 Suppl 96), S129-33.
- Tsuda, M., Beggs, S., Salter, M. W., Inoue, K. (2013). Microglia and intractable chronic pain. *Glia*, 61(1), 55–61.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950), 778–783.
- Tsukahara, T., Masuhara, M., Iwai, H., Sonomura, T., Sato, T. (2015). Repeated stress-induced expression pattern alterations of the hippocampal chloride transporters KCC2 and NKCC1 associated with behavioral abnormalities in female mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(1), 145–151.
- Tsuruga, K., Hashimoto, T., Kato, R., KATO, R., Uchida, Y., Hase, T., Morimoto, Y. (2016). Plantar injection of formalin in rats reduces the expression of a potassium chloride cotransporter KCC2 in the spinal cord and a kinase inhibitor suppresses this reduction. *Biomedical Research*, 37(4), 243–249.
- Üçeyler, N., Zeller, D., Kahn, A.K., Kewenig, S., Kittel-Schneider, S., Schmid, A., Casanova-Molla, J., Reiners, K., Sommer, C. (2013). Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain*, 136(6), 1857–1867.
- Valencia-de Ita, S., Lawand, N. B., Lin, Q., Castan, G., Willis, W. D. (2006). Role of the Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. *Journal of Neurophysiology*, 95, 3553–3561.
- Vanegas, H., Schaible, H.-G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews*, 46(3), 295–309.
- Vinay, L., Jean-Xavier, C. (2008). Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain Research Reviews*, 57(1), 103–10.
- Voss, A. A. (2009). Extracellular ATP inhibits chloride channels in mature mammalian skeletal muscle by activating P2Y1 receptors. *The Journal of Physiology*,

587(23), 5739–5752.

- Wallace, D. J., Linker-Israeli, M., Hallegua, D., Silverman, S., Silver, D., Weisman, M. H. (2001). Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology (Oxford, England)*, 40(7), 743–9.
- Wang, H., Moser, M., Schiltenswolf, M., Buchner, M. (2008). Circulating cytokine levels compared to pain in patients with fibromyalgia a prospective longitudinal study over 6 months. *The Journal of Rheumatology*, 35 (7), 1366–70.
- Watanabe, M., Fukuda, A. (2015). Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9 (September), 1–14.
- Wei, B., Kumada, T., Furukawa, T., Inoue, K., Watanabe, M., Sato, K., Fukuda, A. (2013). Pre- and post-synaptic switches of GABA actions associated with Cl⁻ homeostatic changes are induced in the spinal nucleus of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroscience*, 228, 334–348.
- Wei, H., Hao, B., Huang, J. L., Ma, A. N., Li, X. Y., Wang, Y. X., Pertovaara, A. (2010). Intrathecal administration of a gap junction decoupler, an inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1, or a GABA_A receptor agonist attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(2), 377–383.
- Wells, J. A., Shibata, S., Fujikawa, A., Takahashi, M., Saga, T., Aoki, I. (2017). Functional MRI of the reserpine-induced putative rat model of fibromyalgia reveals discriminatory patterns of functional augmentation to acute nociceptive stimuli. *Scientific Reports*, 38325.
- Williams, D. A., Clauw, D. J. (2009). Understanding fibromyalgia: lessons from the broader pain research community. *The Journal of Pain*, 10(8), 777–791.
- Willis, E. F., Clough, G. F., Church, M. K. (2004). Investigation into the mechanisms by which nedocromil sodium, frusemide and bumetanide inhibit the histamine-induced itch and flare response in human skin in vivo. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(3), 450–5.
- Wolfe, F., Claw, D. J., Fitzcharles, M. A., Goldenberg, D. L., Hauser, W., Katz, R. S., Mease, P., Russell, A. S., Russell, I. J., Winfield, J. B. (2011). Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. *The Journal of*

-
- Rheumatology*, 38(6), 1113–1122.
- Wolfe, F., Smythe, H. A., Yunus, M. B., Bennett, R. M., Bombardier, C., Goldenberg, D. L., Tugwell, P., Campbell, S. M., Abeles, M., Clark, P. (1990). The american college of rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 33(2), 160–72.
- Wood, P. B., Kablinger, A. S., Caldito, G. S. (2005). Open trial of pindolol in the treatment of fibromyalgia. *Annals of Pharmacotherapy*, 39(11), 1812–1816.
- Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140, 441–451.
- Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742–4.
- Woolf, C. J., Doubell, T. P. (1994). The pathophysiology of chronic pain increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Current Opinion in Neurobiology*, 4(4), 525–534.
- Woolf, C. J., Ma, Q. (2007). Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364.
- Yasui, M., Yoshimura, T., Takeuchi, S., Tokizane, K., Tsuda, M., Inoue, K., Kiyama, H. (2014). A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia*, 62(9), 1407–1417.
- Yen, L. T., Hsieh, C. L., Hsu, H. C., Lin, Y. W. (2017). Targeting ASIC3 for relieving mice fibromyalgia pain: roles of electroacupuncture, opioid, and adenosine. *Scientific Reports*, 7, 46663.
- Younger, J., Noor, N., McCue, R., Mackey, S. (2013). Low-dose naltrexone for the treatment of fibromyalgia: findings of a small, randomized, double-blind, placebo-controlled, counterbalanced, crossover trial assessing daily pain levels. *Arthritis and Rheumatism*, 65(2), 529–538.
- Yousuf, M. S., Kerr, B. J. (2016). The role of regulatory transporters in neuropathic pain. *Advances in Pharmacology*, 75, 245–271.
- Yousuf, M. S., Zubkow, K., Tenorio, G., Kerr, B. (2017). The chloride co-transporters, NKCC1 and KCC2, in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Neuroscience*, 344, 178–186.
- Zeilhofer, H. U. (2008). Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain-

-
- contributions of inflammation and microglia. *International Immunopharmacology*, 8(2), 182–7.
- Zeilhofer, H. U., Wildner, H., Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory. *Physiological Reviews*, 92, 193–235.
- Zhang, J., Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 772–783.
- Zhang, Z., Wang, X., Wang, W., Lu, Y.-G., Pan, Z. Z. (2013). Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K⁺-Cl⁻ cotransporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Molecular Pharmacology*, 84(4), 511–20.
- Zhu, Y., Lu, S. G., Gold, M. S. (2012). Persistent inflammation increases GABA-induced depolarization of rat cutaneous dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience*, 220, 330–40.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2), 109–10.