



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

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**Regulación de los canales bestrofina-1 y anoctamina-1  
por 17 $\beta$ -estradiol en el dolor neuropático en la rata**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.F.B. DIANA LAURA CALVILLO MONTOYA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN**

**NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

Directora de Tesis

**Dra. Janet Murbartián Aguilar**

Ciudad de México

Agosto, 2023



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Neuroinflamación y Dolor (Laboratorio 4) del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Janet Murbartián Aguilar.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través del programa de becas nacionales, con la beca de maestría número 805514.



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirme culminar esta meta en mi vida.

Al CONAHCYT y CINVESTAV, por todos los recursos brindados para la realización de este proyecto.

A la Dra. Janet Murbartián Aguilar, por permitirme incorporarme a su grupo de trabajo. Por su compromiso en la dirección de este proyecto. Por su exigencia, paciencia y confianza. Por transmitirme el entusiasmo de trabajar en la investigación en neurociencias.

A la Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda y al Dr. Emilio Javier Galván Espinosa, por aceptar formar parte de mi comité sinodal. Por las observaciones y consejos que mejoraron importantemente este trabajo.

A Carlos Javier Martínez Magaña, por enseñarme todo lo que se realiza en el laboratorio 4, por todos los consejos teóricos y prácticos para mejorar constantemente. Por su paciencia y ejemplo.

A Diana Paulina Velázquez Chávez, por la disposición de apoyarme con cualquier técnica. Por los consejos que me ayudaron a poder realizar la cirugía. Por el apoyo moral cuando no me salía nada. Pero, sobre todo, por su amistad.

A Ciciolil Morales Moreno, por enseñarme el modelo de ligadura de nervios espinales L5/L6.

A Julissa González González, porque no existen palabras que describan mi agradecimiento por todo el amor y apoyo incondicional que me das.

A Palmira Acosta Mares y Eva Marcela Solares Rioja, por su amistad. Por todo el apoyo y los buenos momentos.

A la señora Laura Rioja, por la confianza para poder continuar con mis estudios.

A mi familia, en especial a mi tía Nora, mi tío Márquez, Fer, Ana, Sofi, mi abuelita Tere, mis tías Irma, Diana y Beatriz por motivarme siempre a hacer mi mayor esfuerzo. Por todo su apoyo y amor.

A Shareny Freyffeldt, por el apoyo y agilización con todos los trámites correspondientes.

Al señor Andrés Meza, por su amabilidad y palabras de motivación en los días complicados.

A todo el personal de bioterio, biblioteca y vigilancia, por todas las facilidades para la realización de este proyecto.



## **DEDICATORIAS**

A mis papás, Carlos y Laura. Porque a ustedes dedico todos mis logros. Gracias por estar a mi lado en cada paso que doy, por su amor, sacrificio y apoyo. Por ser mi mayor ejemplo e inspiración.

A mi Juli. Por ser mi compañera de vida y en este viaje. Por todo lo que haces por mí.

A mi hermano, Diego. Por siempre motivarme a dar lo mejor de mí. Por tu amor y confianza.



## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Dolor.....	1
1.2. Fisiología del dolor.....	1
1.2.1. Tipos de nociceptores .....	2
1.3. Clasificación del dolor.....	4
1.4. Dolor neuropático .....	7
1.5. Mecanismos de dolor neuropático.....	8
1.5.1. Actividad ectópica.....	8
1.5.2. Sensibilización.....	9
1.5.2.1. Sensibilización periférica.....	10
1.5.2.2. Sensibilización central.....	12
1.5.2.2.1. Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica.....	13
1.5.2.2.2. Activación microglial .....	15
1.5.2.2.3. Pérdida de la inhibición GABAérgica .....	15
1.6. Canales de cloruro activados por calcio .....	18
1.6.1. Anoctaminas.....	19
1.6.2. Bestrofinas .....	21
1.7. Participación de los canales de cloruro activados por calcio en la nocicepción.....	23
1.8. Estrógenos y señalización estrogénica.....	25



1.9. Dimorfismo sexual y dolor .....	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	31
3. HIPÓTESIS.....	32
4. OBJETIVO GENERAL .....	32
4.1. Objetivos específicos.....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1. Ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 (LNE y TNE) .....	33
5.2. Ovariectomía .....	33
5.3. Evaluación de la conducta nociceptiva .....	34
5.4. Fármacos.....	35
5.5. Administración intratecal de fármacos .....	35
5.6. Inmunodetección mediante Western blot.....	35
5.6.1. Extracción y procesamiento de proteínas.....	35
5.6.2. Cuantificación de proteínas .....	36
5.6.3. Western blot .....	36
5.7. Análisis estadístico .....	37
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
6.1. Participación de bestrofina-1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por la LNE o TNE en ratas hembra y macho.....	38
6.2. Regulación de bestrofina-1 por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE .....	38
6.3. Participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE.....	40
6.4. Expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en GRD y médula espinal de ratas hembra y macho con TNE .....	40



6.5. Regulación de la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa en GRD y médula espinal por $17\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE.....	41
6.6. Participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 en ratas macho con TNE .....	42
7. RESULTADOS.....	43
7.1. La ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 inducen alodinia táctil en ratas .....	43
7.2. Efecto del $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la LNE .....	44
7.3. Efecto del $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la TNE .....	45
7.4. Efecto del $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la LNE .....	47
7.5. Efecto del $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la TNE .....	49
7.6. Efecto de la ovariectomía sobre el efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en ratas hembra con TNE.....	51
7.7. Efecto del antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en ratas hembra con TNE .....	54
7.8. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de bestrofina-1 .....	55
7.9. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de anoctamina-1 .....	56
7.10. Efecto de la ovariectomía, reposición de $17\beta$ -estradiol y antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa.....	57
7.11. Efecto de la activación de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en ratas macho con TNE.....	59
8. DISCUSIÓN.....	61
8.1. Los canales de cloruro activados por calcio bestrofina-1 y anoctamina-1 tienen un papel pronociceptivo y participan en el mantenimiento del dolor neuropático.....	61



8.2. Bestrofina-1 participa en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas hembra pero no en machos.....	63
8.3. La participación de bestrofina-1 en el dolor neuropático depende de $17\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa .....	64
8.4. La transección del nervio espinal L5 induce cambios dimórficos en la expresión proteica de bestrofina-1 y este efecto depende de la presencia de $17\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa .....	65
9. CONCLUSIONES .....	69
10. PERSPECTIVAS .....	70
11. REFERENCIAS .....	71



## ABREVIATURAS

$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
4HNE	4-hidroxinonenal
5,6-EET	Ácido 5,6-epoxieicosatrienoico
5-HT	Serotonina
5-HTR	Receptor serotoninérgico
9-AC	Ácido antraceno-9-carboxílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazelopropiónico
AMPAR	Receptor de ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazelopropiónico
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
Ano1	Anoctamina-1
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASIC	Canal iónico sensible a ácido
Asp	Ácido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Best1	Bestrofina-1
CaCC	Canal de cloruro activado por calcio
CaMK	Calcio calmodulina cinasa
Cav	Canal de calcio dependiente de voltaje
CCA	Corteza del cíngulo anterior
CCL2	Quimiocina CCL2
CCL5	Quimiocina CCL5
CFA	Adyuvante completo de Freund
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina



Cl <sup>-</sup>	Ion cloruro
CPF	Corteza prefrontal
CREB	Proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc
CX3CL1	Quimiocina fractalcina
CXCL1	Quimiocina ligando 1
DMSO	Dimetil sulfóxido
E2	17β-estradiol
EEM	Error estándar medio
EPSC	Corriente postsináptica excitatoria
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ERK	Proteína cinasa regulada por señal extracelular
ERα	Receptor de estrógenos alfa
ERβ	Receptor de estrógenos beta
FAP	Fibra aferente primaria
g	Gramo
GABA	Ácido γ-aminobutírico
Glu	Ácido glutámico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GP1B	Receptor membranar de estrógeno 1 acoplado a proteína G
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
GT	Ganglio del trigémino
h	Hora
H <sup>+</sup>	Protón
HCN	Canal modulado por nucleótidos cíclicos y activado por hiperpolarización
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion bicarbonato
HETE	Ácido 5-hidroxiicosatetraenoico
HMGB1	Proteína de alta movilidad 1
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratecal
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor



IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptor de inositol trifosfato
JNK	Cinasa c-jun N-terminal
K <sup>+</sup>	Ion potasio
KCC2	Cotransportador K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup>
Kg	Kilogramo
LNE	Ligadura de nervios espinales L5/L6
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
ME	Médula espinal
mg	Miligramo
Mg <sup>2+</sup>	Ion magnesio
mGluR	Receptor metabotrópico a glutamato acoplado a proteína G
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivoltios
Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
NFA	Ácido niflúmico
NF-KB	Factor nuclear kappa B
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NKCC1	Cotransportador Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup>
nm	Nanómetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NPPB	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico
°C	Grados Celsius
OVX	Ovariectomía
P2X	Receptor purinérgico P2X
P2Y	Receptor purinérgico P2Y
p38	Cinasa activada por mitógeno p38



PAD	Despolarización de la aferente primaria
PAG	Sustancia gris periacueductal
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrogeniones
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RRD	Reflejos de raíz dorsal
RTK	Receptor de tirosina cinasa
RVM	Médula rostral ventromedial
s.c.	Subcutánea
S1	Corteza somatosensorial 1
S2	Corteza somatosensorial 2
SOC	Canal de calcio operado por almacenamiento
SP	Sustancia P
SP-19	Proteína estimulante 1
Src	Protooncogén tirosina cinasa
TLR	Receptor tipo Toll
TM	Segmento transmembranal
TMEM16A	Anoctamina-1
TMEM16B	Anoctamina-2
TMEM16C	Anoctamina 3
TMEM16D	Anoctamina 4
TMEM16E	Anoctamina 5
TMEM16F	Anoctamina 6
TMEM16G	Anoctamina 7
TMEM16H	Anoctamina 8
TMEM16J	Anoctamina 9



TMEM16K	Anoctamina 10
TNE	Transección del nervio espinal L5
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TRESK	Canal de potasio de dos dominios de poro
TrKB	Receptor de tropomiosina cinasa B
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPA1	Receptor de potencial transitorio anquirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vanilloide 1
VDCC	Canal de calcio dependiente de voltaje



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nocicepción .....	4
Figura 2. Clasificación del dolor de acuerdo a su origen neurobiológico. ....	6
Figura 3. Sensibilización periférica .....	12
Figura 4. Sensibilización central .....	13
Figura 5. Pérdida de la inhibición GABAérgica .....	17
Figura 6. Mecanismo de activación de canales de cloruro activados por calcio .....	19
Figura 7. Estructura de las proteínas anoctaminas.....	21
Figura 8. Estructura de las proteínas bestrofinas.....	23
Figura 9. Vías de señalización estrogénicas.....	27
Figura 10. Diseño experimental de la participación de bestrofina-1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por la LNE o TNE en ratas hembra y macho .....	38
Figura 11. Diseño experimental de la regulación de bestrofina-1 en ratas hembra ovariectomizadas con TNE .....	39
Figura 12. Diseño experimental de la regulación de bestrofina-1 por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE .....	39
Figura 13. Diseño experimental de la participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE.....	40
Figura 14. Diseño experimental de la expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en GRD y médula espinal de ratas hembra y macho con TNE .....	41
Figura 15. Diseño experimental de la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa en GRD y médula espinal de ratas hembra con TNE.....	41



Figura 16. Diseño experimental de la participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 en ratas macho con TNE .....	42
Figura 17. Efecto de la LNE y TNE sobre el umbral de retiro mecánico en ratas .....	43
Figura 18. Efecto de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la LNE ....	44
Figura 19. Comparación del efecto de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en hembras y machos con LNE.....	45
Figura 20. Efecto de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la TNE ....	46
Figura 21. Comparación del efecto de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en hembras y machos con TNE.....	47
Figura 22. Efecto del $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la LNE .....	48
Figura 23. Comparación del efecto de $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$ en hembras y machos con LNE.....	49
Figura 24. Efecto del $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia táctil inducida por la TNE.....	50
Figura 25. Comparación del efecto de $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$ en hembras y machos con TNE.....	51
Figura 26. Efecto de la ovariectomía sobre el efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en ratas hembra con TNE .....	52
Figura 27. Regulación del efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ por $17\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE .....	53
Figura 28. Efecto del antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en ratas hembra con TNE/OVX .....	54
Figura 29. Efecto del antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en ratas hembra con TNE.....	55
Figura 30. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de bestrofina-1 en ratas hembra y macho .....	56
Figura 31. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de anoctamina-1 en ratas hembra y macho .....	57



Figura 32. Efecto de la ovariectomía, reposición de  $17\beta$ -estradiol y antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa..... 59

Figura 33. Efecto de la activación de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  en ratas macho con TNE. .... 60



## RESUMEN

En respuesta al dolor neuropático, conductancias a cloruro mediadas por los receptores a GABA<sub>A</sub> extrasinápticos, se activan en presencia de 17β-estradiol y receptores de estrógenos alfa (ERα). Los canales de cloruro activados por calcio (CaCC) bestrofina-1 y anoctamina-1 tienen un efecto pronociceptivo y participan en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas hembra, sin embargo, se desconoce su participación en ratas macho. Por tal razón este trabajo determinó si bestrofina-1 y anoctamina-1 son regulados por 17β-estradiol en ratas con dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5/L6 (LNE) o por la transección del nervio espinal L5 (TNE). La administración intratecal de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1 μg), un bloqueador de canales CaCC, revirtió la alodinia táctil inducida por la LNE y TNE en ratas hembra, pero no en ratas macho. Mientras que la administración intratecal de T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1 μg), un bloqueador selectivo de anoctamina-1, revirtió la alodinia táctil inducida por la LNE y TNE en ratas hembra y macho. Lo que sugiere que bestrofina-1 es regulada de manera diferencial entre hembras y machos. La ovariectomía evitó el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1 μg), mientras que la reposición de 17β-estradiol restituyó el efecto antialodínico en ratas ovariectomizadas. La administración intratecal de MPP, antagonista selectivo de los ERα, eliminó el efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 μg) en ratas con y sin previa manipulación hormonal. Por otra parte, la TNE aumentó la expresión de bestrofina-1 en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) L5 y L4 de ratas hembra, y en el caso de ratas macho, la TNE disminuyó la expresión de bestrofina-1 en GRD L5. No se observó un efecto de la TNE sobre la expresión de anoctamina-1 en ratas hembra o macho. Finalmente, se observó que la expresión de bestrofina-1 se regula por 17β-estradiol y su interacción con ERα en ratas hembra neuropáticas, ya que en ratas hembra con TNE la ovariectomía evitó el incremento en la expresión de bestrofina-1 y ERα, mientras que la reposición de 17β-estradiol permitió el aumento de ambas proteínas, además el antagonismo de los ERα previno el incremento. Estos datos sugieren que bestrofina-1 participa en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas hembra, pero no en ratas macho, mientras que anoctamina-1 participa en ambos sexos.



## ABSTRACT

In response to neuropathic pain, extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptor-mediated chloride conductances are activated in the presence of 17 $\beta$ -estradiol and estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). The calcium-activated chloride channels (CaCC) bestrophin-1 and anoctamin-1 have a pronociceptive effect and participate in the maintenance of neuropathic pain in female rats, nevertheless, their role in male rats is unknown. For this reason, this work determined whether bestrophin-1 and anoctamin-1 are regulated by 17 $\beta$ -estradiol in rats with neuropathic pain induced by L5/L6 spinal nerve ligation (SNL) or L5 spinal nerve transection (SNT). Intrathecal administration of CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1  $\mu$ g), a CaCC blocker, reversed tactile allodynia induced by SNL and SNT in female rats, but not in male rats. Whereas, intrathecal administration of T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1  $\mu$ g), a selective anoctamin-1 blocker, reversed tactile allodynia induced by SNL and SNT in female and male rats. This suggests that bestrophin-1 is differentially regulated between female and male rats. Ovariectomy prevent the antiallodynic effect of CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1  $\mu$ g), whereas 17 $\beta$ -estradiol replacement restored the antiallodynic effect in ovariectomized rats. Intrathecal administration of MPP, a selective ER $\alpha$  antagonist, eliminated the effect of CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 $\mu$ g) in rats with and without prior hormonal manipulation. Besides, SNT increased bestrophin-1 protein expression in L5 and L4 dorsal root ganglia (DRG) in female rats, however, SNT decreased bestrophin-1 expression in L5 DRG in male rats. In addition, SNT did not modify anoctamin-1 protein expression in female or male rats. Finally, it was observed that bestrophin-1 expression is regulated by 17 $\beta$ -estradiol and its interaction with ER $\alpha$  in female neuropathic rats, based on ovariectomy avoids the increase in bestrophin-1 and ER $\alpha$  expression, whereas 17 $\beta$ -estradiol replacement allowed the increment of both proteins, furthermore ER $\alpha$  antagonism prevented the increase. In summary, data obtained suggest that bestrophin-1 is implicated in the maintenance of neuropathic pain in female rats, but not in male rats, while anoctamin-1 is involved in both sexes.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Dolor

El dolor funciona como un mecanismo de protección del organismo que le permite responder y minimizar el contacto ante diversos estímulos que resultan nocivos o dañinos (Świeboda et al., 2013; Woolf, 2010). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor como “*una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada, o similar a la asociada con daño tisular real o potencial*”. El dolor es siempre algo subjetivo, debido a que se percibe e interpreta de manera individual de acuerdo a experiencias previas (Raja et al., 2020).

### 1.2. Fisiología del dolor

El dolor aparece como resultado de un procesamiento complejo de señales a distintos niveles del sistema nervioso (Patapoutian et al., 2009). Este procesamiento se genera a través de la nocicepción, entendida como el mecanismo neuronal a través del cual se codifican los estímulos nocivos (Coghill, 2020; St. John Smith, 2018; Tracey, 2017). La nocicepción comprende cuatro etapas principales (Woolf, 2004):

**Transducción:** este proceso se encuentra mediado por la participación de distintos canales transductores de alto umbral presentes en las terminales periféricas de las fibras aferentes primarias (FAP), también llamados nociceptores (Cioffi, 2018; Woolf, 2004). Dentro de estos canales, se encuentran los receptores de potencial transitorio (TRP), canales iónicos sensibles a ácido (ASIC), receptores purinérgicos (P2X y P2Y), receptores serotoninérgicos (5-HTR), receptores a histamina, entre otros. Estos receptores detectan y convierten estímulos químicos, mecánicos o físicos nocivos en señales eléctricas (Goodwin y McMahon, 2021; Patapoutian et al., 2009).



**Transmisión:** es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de los axones neuronales desde la terminal periférica hasta la terminal central. Posteriormente, los neurotransmisores excitadores liberados son detectados por las neuronas de proyección localizadas en el asta dorsal de la médula espinal. Además, esta información se envía a través de vías ascendentes (tracto espinotalámico y espinoreticular) hacia centros supraespinales (Cioffi, 2018; Patapoutian et al., 2009; Woolf, 2004, 2010).

**Integración e interpretación:** la información nociceptiva llega hasta estructuras cerebrales que determinan la percepción consciente del dolor (Fenton et al., 2015; Woolf, 2004). Las cortezas somatosensoriales 1 (S1) y 2 (S2) se encargan de codificar las características, ubicación y duración del dolor (Apkarian et al., 2005; Bushnell et al., 2013). Posteriormente, la corteza del cíngulo anterior (CCA) procesa las sensaciones no placenteras; mientras que la corteza prefrontal (CPF) racionaliza al dolor y está implicada en el aspecto contextual del mismo (Leknes y Tracey, 2008). Finalmente, la ínsula integra los estímulos sensoriales con aspectos emocionales y cognitivos, mientras que la amígdala codifica respuestas emocionales y motivacionales (Apkarian et al., 2005; Bushnell et al., 2013; Sneddon, 2019).

**Modulación:** se refiere al aumento (facilitación) o reducción (inhibición) de la transmisión de la información nociceptiva de acuerdo con las necesidades del organismo (**Figura 1**) (Fenton et al., 2015).

### 1.2.1. Tipos de nociceptores

Los nociceptores son una subpoblación de fibras nerviosas periféricas especializadas en la detección de estímulos nocivos (Basbaum et al., 2009). Los nociceptores son neuronas pseudounipolares que constan de una rama axonal periférica que inerva al tejido blanco, un soma localizado en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) o ganglio del trigémino (GT) para inervar el cuerpo o la cara, respectivamente (Basbaum et al., 2009; Dubin y Patapoutian, 2010; Kuner, 2010), además de una rama axonal central. Este axón permite la



conexión entre el sistema nervioso periférico y sistema nervioso central. Debido a que se presentan sinapsis con neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal o en el subnúcleo caudal del trigémino (Middleton et al., 2021; Westlund, 2000; Woolf y Ma, 2007).

Las fibras aferentes primarias se clasifican de acuerdo al grado de mielinización, diámetro y velocidad de conducción en tres tipos (Millan, 1999):

**Fibras A $\beta$ :** son sensores táctiles altamente mielinizados (Kuner, 2010), de diámetro grande (más de 10  $\mu\text{m}$ ); con velocidad de conducción rápida (30-100 m/s) (Millan, 1999) y responden a la estimulación mecánica inocua (Basbaum et al., 2009; Woller et al., 2017).

**Fibras A $\delta$ :** son fibras ligeramente mielinizadas, de diámetro mediano (2-6  $\mu\text{m}$ ); con velocidad de conducción intermedia (12-30 m/s), y regulan el dolor agudo, bien localizado (Cioffi, 2018; Dubin y Patapoutian, 2010; Millan, 1999). De acuerdo a las características de su respuesta, las fibras A $\delta$  se han subdividido en dos clases:

**Fibras A $\delta$  tipo I:** son polimodales, responden a estímulos mecánicos, químicos y físicos, con umbrales a estímulos térmicos altos (más de 50  $^{\circ}\text{C}$ ) (Basbaum et al., 2009).

**Fibras A $\delta$  tipo II:** presentan un umbral a estímulos térmicos bajo (42-45  $^{\circ}\text{C}$ ) y un umbral a estímulos mecánicos alto. Estas fibras regulan la respuesta inmediata frente al calor nocivo (Basbaum et al., 2009; Woolf y Ma, 2007).

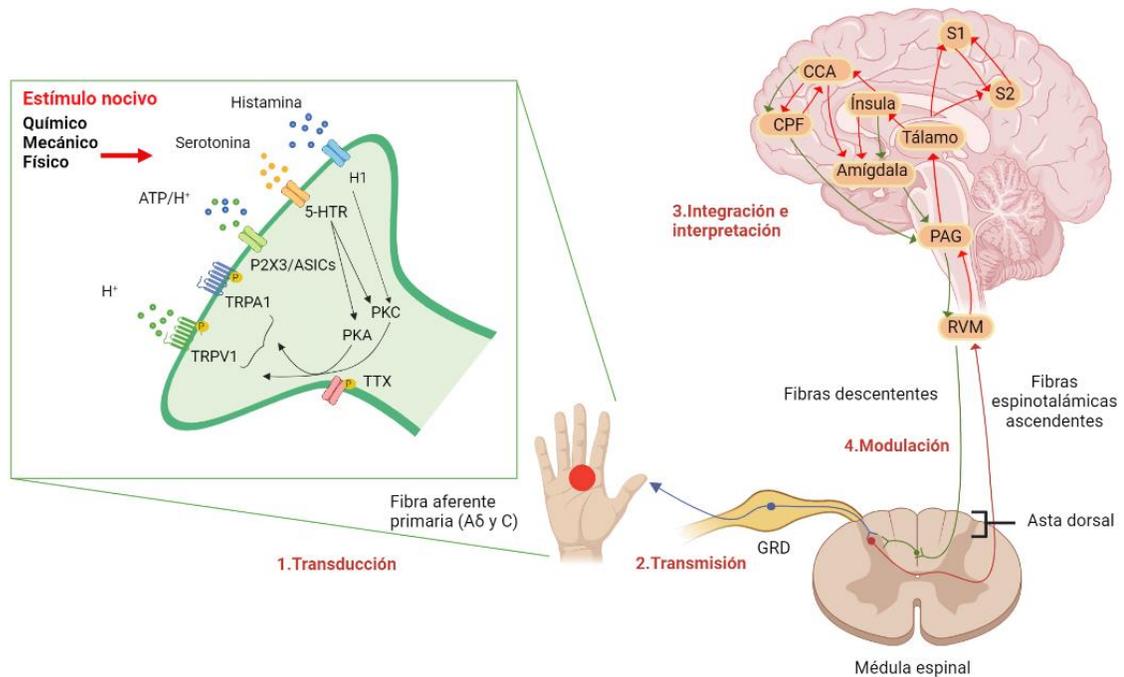
**Fibras C:** son fibras no mielinizadas de diámetro pequeño (0.4-1.2  $\mu\text{m}$ ), con velocidad de conducción lenta (0.5-2 m/s) (Millan, 1999). Representan la mayoría de las fibras sensoriales en el sistema nervioso periférico (cerca del 70%) (Woolf y Ma, 2007), son polimodales y se clasifican en peptidérgicas y no peptidérgicas (Chen et al., 2006).

**Fibras C peptidérgicas:** se caracterizan por la liberación de sustancia P y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), además



de expresar el receptor de neurotrofina TrkA (Middleton et al., 2021; Woolf y Ma, 2007).

**Fibras C no peptidérgicas:** expresan al receptor de neurotrofina c-Ret y al receptor purinérgico P2X3, además se unen a la isolectina IB4 (Dubin y Patapoutian, 2010; Middleton et al., 2021).



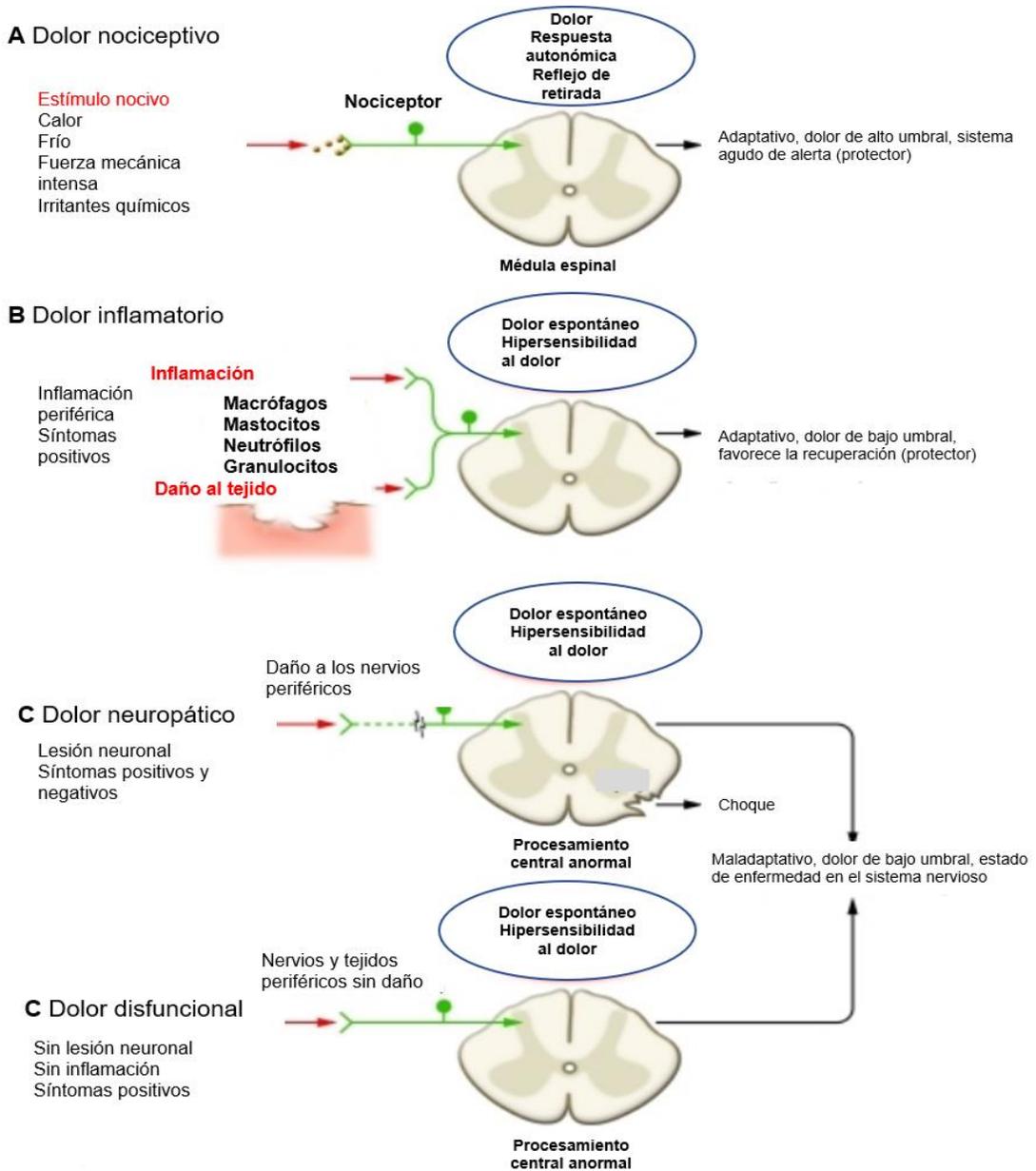
**Figura 1. Nocicepción.** La nocicepción consta de cuatro etapas principales: 1. Transducción, 2. Transmisión, 3. Integración e interpretación, 4. Modulación. Modificado de (Chen y Abdi, 2022).

### 1.3. Clasificación del dolor

El dolor se clasifica de acuerdo a su temporalidad en agudo y crónico. El dolor agudo se presenta a corto plazo y se resuelve en un período menor a 3 meses. Este tipo de dolor se relaciona con lesión o trauma y funciona como un sistema de alarma para el organismo. El dolor crónico se caracteriza por tener un mecanismo continuo o intermitente que genera un dolor a largo plazo, es decir, de 3 meses o más. Este tipo de dolor está asociado con procesos de tipo patológicos, incluidos los de naturaleza psicológica (Montgomery-Orr et al., 2017).



Desde una perspectiva neurobiológica, el dolor se divide en cuatro tipos: dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor neuropático y dolor disfuncional. A su vez, se dividen en dos grupos: los de tipo adaptativo, que incluyen al dolor nociceptivo y al dolor inflamatorio; estos tipos de dolor se consideran protectores. Por otra parte, los de tipo maladaptativo comprenden al dolor neuropático y al dolor disfuncional, que son resultado de un mal funcionamiento a nivel del sistema nervioso, es decir, dolor patológico (Woolf, 2010) (**Figura 2**).



**Figura 2. Clasificación del dolor de acuerdo a su origen neurobiológico.** A) Dolor nociceptivo, B) Dolor inflamatorio, C) Dolor neuropático y D) Dolor disfuncional. Modificado de (Woolf, 2010).

**Dolor nociceptivo:** es un dolor de tipo fisiológico, relacionado con la detección de estímulos nocivos de alto umbral, pues solo se activa con estímulos químicos, físicos o mecánicos intensos. Su activación es secundaria a lesiones en tejidos. El dolor nociceptivo se subdivide en dolor somático y visceral. El dolor somático incluye lesiones en el sistema musculoesquelético, mientras



que el dolor visceral hace referencia a daño en tejidos internos (Montgomery-Orr et al., 2017; Woolf, 2010).

**Dolor inflamatorio:** se produce en respuesta a un daño tisular que induce la participación y activación del sistema inmune, este tiene la capacidad de incrementar la sensibilidad sensorial después de que se produce el daño, además favorece la recuperación al disminuir el contacto físico y el movimiento (Woolf, 2010).

**Dolor neuropático:** se genera como consecuencia de actividad neuronal irregular, que puede ser secundaria a una lesión o disfunción del sistema somatosensorial (Montgomery-Orr et al., 2017).

**Dolor disfuncional:** surge en condiciones en las que no se presentan situaciones de daño aparente, es decir, se presenta hipersensibilidad al dolor. Sin embargo, no existe estímulo nocivo o condición inflamatoria que lo desencadene y se asocia a un mal procesamiento de la información nociceptiva (Montgomery-Orr et al., 2017; Woolf, 2010).

#### 1.4. Dolor neuropático

De acuerdo a la IASP, el dolor neuropático se define como “*dolor causado por una lesión o enfermedad en el sistema somatosensorial*” (Scholz et al., 2019). Este tipo de dolor se considera como el dolor más debilitante y tiene una prevalencia a nivel mundial entre el 7 y 10% (van Hecke et al., 2014). En el dolor neuropático se presenta alodinia (dolor frente a un estímulo que no produce dolor). Por otra parte, se presenta hiperalgesia (aumento de la percepción ante un estímulo que produce dolor). Además, aparecen parestesias (percepción de sensaciones anómalas) y dolor espontáneo (Costigan et al., 2009; Rosenberger et al., 2020; Scholz et al., 2019; St. John Smith, 2018; Szok et al., 2019; Xie et al., 2022).

El dolor neuropático se clasifica en periférico y central, de acuerdo con la etiología de la lesión del sistema nervioso o la distribución anatómica del daño



(Cavalli et al., 2019; Woolf y Mannion, 1999). El dolor neuropático periférico incluye a la neuralgia del trigémino, dolor neuropático por lesión de nervio periférico, polineuropatía dolorosa, neuralgia posherpética y radiculopatía dolorosa. El dolor neuropático central comprende al dolor asociado con lesión de la médula espinal, dolor neuropático central asociado a lesión cerebral, dolor neuropático central posterior a ictus y dolor neuropático central causado por esclerosis múltiple (Costigan et al., 2009; Scholz et al., 2019; Szok et al., 2019).

### **1.5. Mecanismos de dolor neuropático**

Los mecanismos que subyacen al dolor neuropático afectan a distintos niveles del sistema nervioso periférico y central, conduciendo a estados de hiperexcitabilidad sostenida (Meacham et al., 2017; Nickel et al., 2012). A la fecha algunos de los mecanismos mejor descritos son la actividad ectópica, sensibilización periférica y sensibilización central (Costigan et al., 2009; Gilron et al., 2015; Nickel et al., 2012).

#### **1.5.1. Actividad ectópica**

Posterior a una lesión nerviosa, se produce dolor en ausencia de un estímulo identificable, es decir, dolor espontáneo (Costigan et al., 2009; von Hehn et al., 2012). El dolor espontáneo es resultado de hiperexcitabilidad en las fibras aferentes primarias, que producen descargas de potenciales de acción ectópicos en el neuroma (extremo lesionado del axón), soma neuronal, neuronas aferentes intactas proximales al sitio de lesión, así como en fibras aferentes primarias de bajo umbral (Campbell y Meyer, 2006; Costigan et al., 2009). La actividad ectópica participa en dos funciones: (1) como una señal de sensaciones espontáneas contribuyendo significativamente a la presencia de parestesias y disestesias y, (2) como inductora de la sensibilización central (Devor, 2009). La aparición de actividad ectópica conlleva alteraciones en la expresión, distribución y propiedades de activación/inactivación de los



distintos tipos de canales iónicos y receptores ubicados en las fibras aferentes primarias (Amir et al., 2005; Campbell y Meyer, 2006; Gilron et al., 2015; van Hecke et al., 2014). Esto provoca cambios en las propiedades intrínsecas membranales que generan descargas repetitivas en ausencia de un estímulo (Amir et al., 2005; van Hecke et al., 2014). El aumento en la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 se asocia con la aparición de descargas ectópicas, debido a que la acumulación de estos canales reduce el umbral para la generación del potencial de acción en los sitios de impulsos ectópicos (Devor, 2006; Dib-Hajj et al., 2010; Sheets et al., 2008). Aunado a esto, posterior a una lesión nerviosa se incrementa la expresión de Nav1.3, un canal que en condiciones fisiológicas no se expresa en las neuronas sensoriales (Fukuoka et al., 2008; Rosenberger et al., 2020; Wood et al., 2004). Además, los canales de calcio tipo N (Cav2.2), la subunidad auxiliar de este canal ( $\alpha 2\delta 1$ ) (Altier et al., 2007; Saegusa et al., 2010; Zamponi et al., 2009) y los canales de calcio tipo T (Cav3.2) (Zamponi et al., 2009) se encuentran regulados al alza en neuronas del GRD después de una lesión, lo que sugiere su participación en la transmisión de señales nociceptivas patológicas. Por otra parte, los canales de potasio, particularmente los canales de dos dominios de poro (TRESK) se regulan a la baja de manera importante, lo que conduce a procesos de despolarización en la membrana neuronal sensorial (Busserolles et al., 2016; Tulleuda et al., 2011; von Hehn et al., 2012). Además, los canales modulados por nucleótidos cíclicos y activados por hiperpolarización (HCN), presentes en las fibras sensoriales también participan en la generación de actividad ectópica (Chaplan et al., 2003; Rosenberger et al., 2020).

### **1.5.2. Sensibilización**

De acuerdo con la IASP, la sensibilización se define como *“aumento de la capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas a su entrada normal y/o reclutamiento de una respuesta a entradas normalmente por debajo del*



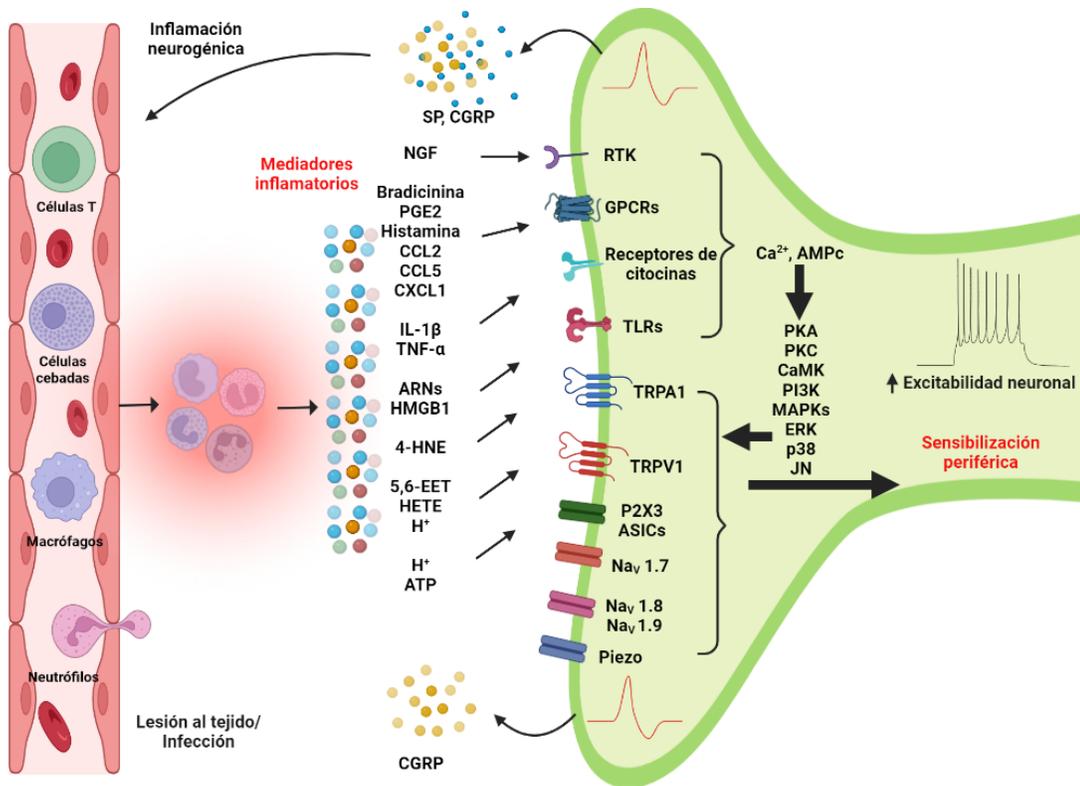
*umbral*" (Sun et al., 2021). La sensibilización se puede presentar a nivel periférico y central (Ji et al., 2003; Meacham et al., 2017; von Hehn et al., 2012).

### **1.5.2.1. Sensibilización periférica**

Definida como "*mayor capacidad de respuesta y umbral reducido en las neuronas nociceptivas en la periferia a la estimulación de sus campos receptivos*" (Sun et al., 2021). La lesión en los tejidos conduce a una inflamación periférica y liberación de mediadores inflamatorios por nociceptores y células no neuronales (células cebadas, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos, basófilos) en la zona de inflamación del tejido (Campbell y Meyer, 2006; Costigan et al., 2009; Gilron et al., 2015; Meacham et al., 2017; Mizumura, 1997; von Hehn et al., 2012). Dentro de las moléculas de señalización liberadas se encuentran mediadores clásicos como prostaglandina E2 (PGE2), serotonina (5-HT), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis de tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bradicinina, histamina, factor de crecimiento neural (NGF), trifosfato de adenosina (ATP), protones (H<sup>+</sup>), tromboxanos, leucotrienos (Campbell y Meyer, 2006; Gangadharan y Kuner, 2013; Jarvis y Boyce-Rustay, 2009; Ji et al., 2014; Mizumura, 1997; Verma et al., 2015; von Hehn et al., 2012). De igual manera, ocurre la liberación de mediadores emergentes como péptidos N-formilados bacterianos (Chiu et al., 2013) y microARN (Park et al., 2014). Esta liberación produce una interacción ligando-receptor, con los receptores acoplados a proteínas G o tirosina cinasa ubicados en la membrana de las fibras aferentes primarias (principalmente fibras A $\delta$  y C) (Jarvis y Boyce-Rustay, 2009; Verma et al., 2015). Dicha interacción activa vías de transducción de señales intracelulares en la terminal neuronal que controlan la excitabilidad neuronal. Dentro de estas vías se encuentran las de la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), calcio calmodulina cinasa (CaMK), fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) como p38-MAPK,



proteína cinasa regulada por señal extracelular (ERK) y cinasa c-jun N-terminal (JNK). Estas cinasas fosforilan canales transductores como el receptor de potencial transitorio vanilloide 1 (TRPV1), receptor de potencial transitorio anquirina 1 (TRPA1), canales PIEZO2, canales de sodio Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8, y Nav1.9 (Gangadharan y Kuner, 2013; Gilron et al., 2015; Jarvis y Boyce-Rustay, 2009; Ji et al., 2003, 2014; Verma et al., 2015; Zhang et al., 2005). Estas cinasas son capaces de regular la expresión de canales a través de un incremento en su transcripción génica, que, en conjunto conducen a una disminución en el umbral de activación de los nociceptores y un aumento en su tasa de activación (Campbell y Meyer, 2006; Jarvis y Boyce-Rustay, 2009; Ji et al., 2014). Los nociceptores sensibilizados liberan cantidades excesivas de neurotransmisores como glutamato y neuromoduladores como sustancia P, CGRP, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y mediadores inflamatorios. Todos ellos participan en la generación de inflamación neurogénica, mediante la regulación de procesos como disminución del pH, aumento de la temperatura y vasodilatación. Estos procesos generan un circuito aberrante, que favorece la sensibilización central y con ello el mantenimiento del dolor patológico (**Figura 3**) (Campbell y Meyer, 2006; Gilron et al., 2015; Meacham et al., 2017; Verma et al., 2015; Yang et al., 2022).



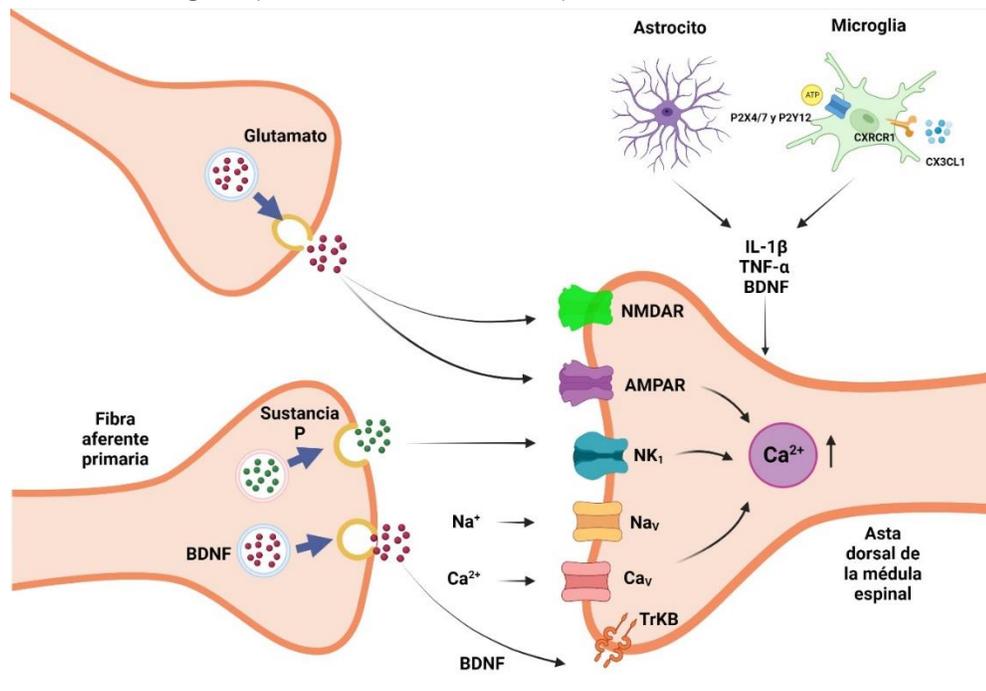
**Figura 3. Sensibilización periférica.** La lesión en los tejidos conduce a una inflamación periférica que da como resultado la liberación de mediadores inflamatorios por nociceptores y células no neuronales en la zona de inflamación del tejido. Esta liberación produce una interacción ligando-receptor, con los receptores acoplados a proteínas G o tirosina cinasa ubicados en la membrana de las fibras aferentes primarias, que activa vías de transducción de señales intracelulares en la terminal neuronal que controlan la excitabilidad neuronal, esto conduce a una disminución en el umbral de activación de los nociceptores y un aumento en su tasa de activación. A su vez, los nociceptores sensibilizados liberan cantidades excesivas de neurotransmisores y neuromoduladores que participan en la generación de inflamación neurogénica. Modificado de (Ji et al., 2014).

### 1.5.2.2. Sensibilización central

La sensibilización central se define como “*aumento de la capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas en el sistema nervioso central a su entrada aferente normal o subumbral*” (Sun et al., 2021). Si bien los niveles talámico y cortical también pueden estar involucrados, la mayor parte de los mecanismos descritos se encuentran a nivel de la asta dorsal de la médula espinal (**Figura 4**) (Campbell y Meyer, 2006). La sensibilización central integra además vías nociceptivas que normalmente no participan en el dolor, como



las fibras A $\beta$  mecanorreceptoras de bajo umbral (Latremoliere y Woolf, 2009). La sensibilización central facilita el procesamiento nociceptivo gracias al establecimiento de un estado de hiperexcitabilidad sostenido (Basbaum et al., 2009), produciendo con ello un incremento en la sensibilidad al dolor aun cuando el estímulo inicial ha desaparecido (Latremoliere y Woolf, 2009). La mejora en el procesamiento nociceptivo se puede deber a incrementos en la excitabilidad membranal, eficacia sináptica o procesos de inhibición neuronal reducidos (Latremoliere y Woolf, 2009; Sun et al., 2021). Siendo los mecanismos implicados en la sensibilización central las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica, la pérdida de la inhibición GABAérgica y la activación microglial (Basbaum et al., 2009).



**Figura 4. Sensibilización central.** La activación sostenida de las fibras aferentes primarias desencadena la liberación de glutamato, sustancia P y BDNF en la sinapsis con las neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal, esto incrementa la actividad de receptores glutamatérgicos y se facilita un estado de despolarización membranal persistente. A su vez, las células gliales liberan mediadores inflamatorios que favorecen la hiperexcitabilidad neuronal establecida. Modificado de (Dureja et al., 2017).

#### 1.5.2.2.1. Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica

La comunicación sináptica excitatoria entre las FAP y las neuronas de proyección del asta dorsal están mediadas por glutamato y neuromoduladores



como la sustancia P, CGRP y BDNF (Ji et al., 2019; Liu et al., 2022; Woolf, 2012). La liberación de glutamato de las terminales centrales de la FAP produce corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) en las neuronas de proyección mediante la activación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA y NMDAR) y receptores metabotrópicos (mGluRs) (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2019; Latremoliere y Woolf, 2009; Viswanath et al., 2020). La activación de los NMDAR es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización central. En condiciones fisiológicas los NMDAR se encuentran bloqueados por un ion  $Mg^{2+}$  que se localiza en el poro del receptor (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2019; Latremoliere y Woolf, 2009; Liu et al., 2022; Viswanath et al., 2020; Yang et al., 2022). La liberación masiva de neurotransmisores como el glutamato y neuromoduladores como la sustancia P, BDNF y CGRP por parte de las neuronas periféricas conduce a una despolarización membranal suficiente para remover el  $Mg^{2+}$  que bloquea el poro de NMDAR produciendo una corriente de entrada mediada por este receptor (Liu et al., 2022; Viswanath et al., 2020; Woolf, 2012). El consiguiente incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular activa diversas proteínas cinasas como CaMK, PKA, PKC que fosforilan a los receptores glutamatérgicos, facilitando la eficacia sináptica al aumentar el tiempo de apertura y promoviendo el tráfico de receptores hacia la membrana sináptica. Por otra parte, la estimulación de los receptores glutamatérgicos activa vías intracelulares que mantienen la sensibilización central, como la vía de la fosfolipasa C (PLC)/PKC mediante la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y MAPK que involucra a las cinasas ERK. ERK ejerce efectos como la fosforilación de la subunidad NR1 de NMDAR, reclutamiento de AMPAR a la membrana y una disminución de las corrientes de  $K^+$ , que en conjunto incrementan la excitabilidad neuronal, favoreciendo la transmisión de la información nociceptiva hacia centros supraespinales (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2019; Latremoliere y Woolf, 2009; Liu et al., 2022; Viswanath et al., 2020).



#### 1.5.2.2.2. Activación microglial

En el dolor neuropático, la lesión a los nervios produce la liberación de moléculas de señalización como el ATP que se libera por neuronas sensoriales lesionadas, células microgliales, astrocitos o células T (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2019; Latremoliere y Woolf, 2009; Viswanath et al., 2020). El ATP, mediante su unión a los receptores purinérgicos P2X4/7 y P2Y12, activa a la microglía de la asta dorsal de la médula espinal. La microglía produce y libera diversos neuromoduladores como factores tróficos, neurotransmisores, citocinas y especies reactivas de oxígeno. Su interacción con las neuronas sensoriales contribuye a la inducción y mantenimiento de la sensibilización central (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2019; Verma et al., 2015; Yang et al., 2022). Por ejemplo, la quimiocina CX3CL1 se expresa en neuronas y astrocitos, en tanto que su receptor se expresa en la microglía, lo cual sugiere una interacción entre la quimiocina y estas células. La activación microglial como resultado de la lesión nerviosa se caracteriza por la participación de diversas vías intracelulares como la activación de la p38-MAPK, ERK y cinasas de la familia Src; su activación incrementa la excitabilidad neuronal al modificar la función y tráfico de receptores glutamatérgicos. La microglía activada también libera BDNF e IL-1 $\beta$ . El BDNF actúa sobre receptores TrkB en las neuronas de proyección presentes en la lámina I, disminuyendo la expresión del cotransportador KCC2, con lo que se desencadena el mecanismo de desinhibición GABAérgica, favoreciendo las respuestas despolarizantes bajo estas condiciones (Basbaum et al., 2009; Gangadharan y Kuner, 2013; Ji et al., 2019; Latremoliere y Woolf, 2009; Verma et al., 2015; Yang et al., 2022).

#### 1.5.2.2.3. Pérdida de la inhibición GABAérgica

En las neuronas el gradiente de Cl<sup>-</sup> se establece principalmente por la acción de los cotransportadores catión-cloruro, como el cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (NKCC1) que transporta iones Cl<sup>-</sup> desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula y el cotransportador K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC2) que transporta Cl<sup>-</sup> desde el interior celular hacia el exterior (**Figura 5**). En el caso particular de las fibras



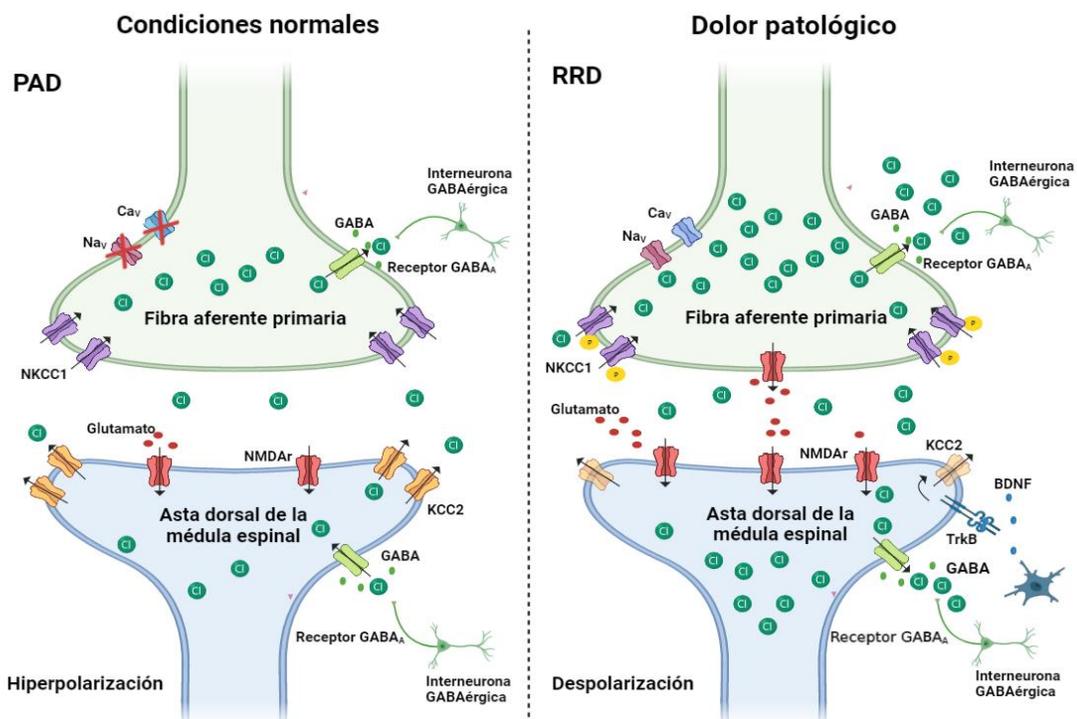
aferentes primarias, estas expresan NKCC1 y no KCC2, favoreciendo una concentración elevada de  $\text{Cl}^-$  intracelular (Boudes y Scamps, 2012; Ferrera et al., 2011; Li et al., 2016; Mao et al., 2012; Price et al., 2010).

En condiciones fisiológicas, la modulación de la información nociceptiva se da en parte gracias a la diferencia en la expresión de dichos cotransportadores. La actividad de KCC2 en las neuronas de proyección de la médula espinal produce un potencial de inversión de  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}}$ ) de alrededor de  $-60$  mV y una concentración intracelular cercana a  $12$  mM. Como resultado de ello, la activación de una conductancia a  $\text{Cl}^-$  mediada por receptores GABA, receptores a glicina o canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , produce un efecto hiperpolarizante mediado por la salida de  $\text{Cl}^-$ . Por otra parte, en las fibras aferentes primarias, como consecuencia de la actividad de NKCC1 el  $E_{\text{Cl}}$  se encuentra alrededor de  $-40$  mV y la concentración intracelular es aproximadamente de  $58$  mM (Kaneko et al., 2004; Rocha-González et al., 2008). En estas neuronas la activación de una conductancia a  $\text{Cl}^-$  induce una corriente saliente de  $\text{Cl}^-$  provocando una pequeña respuesta despolarizante, conocida como despolarización de la aferente primaria (PAD). Esta despolarización produce un fenómeno de corto circuito que inactiva canales de sodio y calcio dependientes de voltaje y, por consiguiente, se reduce la excitabilidad neuronal y con ello la transmisión de la información nociceptiva (Boudes y Scamps, 2012; Ferrera et al., 2011; Li et al., 2016; Mao et al., 2012; Price et al., 2010).

En condiciones de dolor patológico, las neuronas de proyección tienen una expresión disminuida de KCC2. La disminución está mediada por un mecanismo que involucra la activación de BDNF-TrKB en neuronas de segundo orden (Coull et al., 2003). Esto conduce a una acumulación de  $\text{Cl}^-$  al interior neuronal, por lo tanto, la activación de una conductancia a  $\text{Cl}^-$  induce la salida del anión de la célula provocando la despolarización neuronal, esto favorece que la información nociceptiva fluya hacia centros supraespinales contribuyendo al incremento en la sensación dolorosa. Asimismo, en las fibras



aferentes primarias se produce un incremento en la actividad de NKCC1 (debido a un aumento en el estado fosforilado del cotransportador). El aumento en la actividad de NKCC1 produce una acumulación de  $\text{Cl}^-$  intracelular que modifica  $E_{\text{Cl}}$  hasta potenciales de  $-20 \text{ mV}$ . Bajo estas condiciones, la activación de conductancias a  $\text{Cl}^-$  aumenta aún más la despolarización neuronal, por lo cual las neuronas pasan de generar PAD, que funcionan como un mecanismo inhibitorio, a producir propiamente potenciales de acción, conocidos como reflejos de raíz dorsal (RRD). Estos RRD tienen la capacidad de ser transmitidos ortodrómicamente, es decir hacia las neuronas de proyección y antidrómicamente, hacia la propia terminal periférica de las fibras aferentes primarias, generando una actividad eléctrica exacerbada (Boudes y Scamps, 2012; Ferrera et al., 2011; Li et al., 2016; Mao et al., 2012; Price et al., 2010).



**Figura 5. Pérdida de la inhibición GABAérgica.** En las neuronas del sistema nervioso, el gradiente de  $\text{Cl}^-$  se establece principalmente por la acción de los cotransportadores catión-cloruro, NKCC1, encargado de transportar iones  $\text{Cl}^-$  desde el espacio extracelular hacia el interior de las células y KCC2 que transporta el  $\text{Cl}^-$  desde el interior celular hacia el exterior. De manera fisiológica, en las neuronas de proyección la activación de una conductancia a  $\text{Cl}^-$  permite el ingreso del ion al interior celular, favoreciendo un estado de hiperpolarización que contribuye a la modulación de la información nociceptiva. En las FAP, la activación de



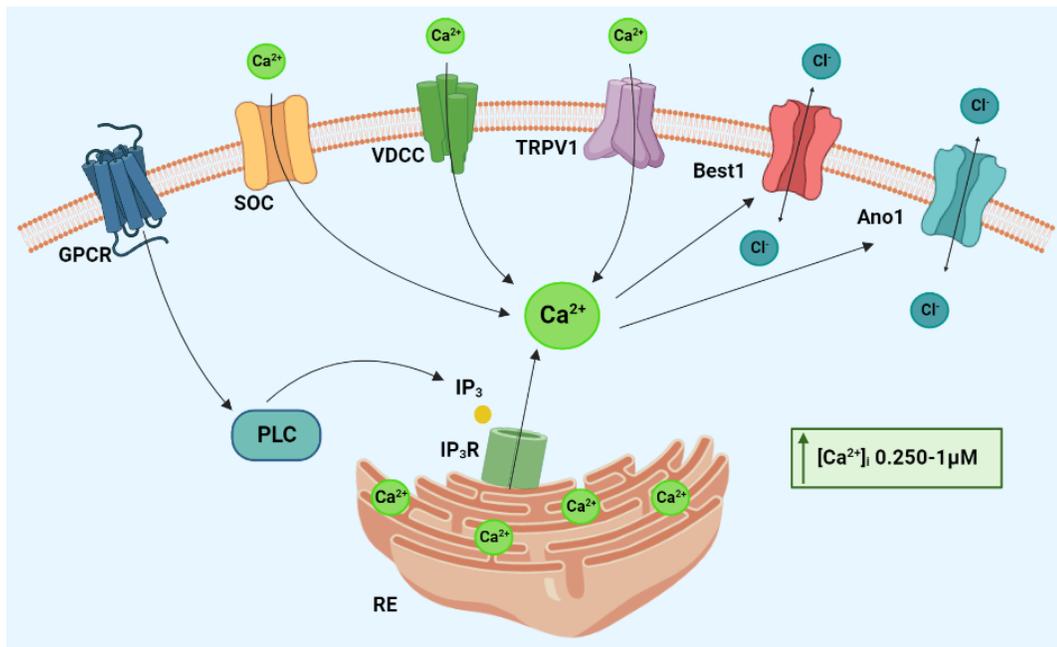
conductancias a  $\text{Cl}^-$  induce una corriente de  $\text{Cl}^-$  dada por la salida del anión de la célula, produciendo una pequeña despolarización que se conoce como despolarización de la aferente primaria (PAD), esta despolarización provoca la inactivación de los canales de sodio ( $\text{Na}_v$ ) y calcio ( $\text{Ca}_v$ ) dependientes de voltaje, con lo que se inhibe la transmisión de la información nociceptiva. En condiciones de daño a los nervios, en las neuronas de proyección, se disminuye la expresión del cotransportador KCC2, producida por la interacción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) con su receptor TrkB por un mecanismo no dilucidado. Esto genera una acumulación de  $\text{Cl}^-$  intracelular, que lleva a la salida del anión una vez que se activa una conductancia a  $\text{Cl}^-$  favoreciendo la despolarización neuronal que a su vez facilita que la información fluya hacia centros supraespinales. En el caso de las FAP, los cotransportadores NKCC1 presentes en la membrana, son fosforilados lo cual incrementa su función, esto produce una mayor acumulación de  $\text{Cl}^-$  intracelular, por lo cual cuando se activan las conductancias a  $\text{Cl}^-$  el anión sale de la célula, produciendo respuestas despolarizantes que alcanzan a convertirse en potenciales de acción, conocidos como reflejos de raíz dorsal (RRD), estos RRD tienen la capacidad de viajar tanto ortodrómicamente, es decir, hacia las neuronas de proyección, como antidrómicamente, hacia la terminal periférica de la propia FAP.

### 1.6. Canales de cloruro activados por calcio

Los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) son proteínas membranales que participan en diversos procesos fisiológicos, como son el control de la excitabilidad neuronal y cardíaca, regulación del volumen celular, regulación de la concentración iónica, nocicepción, transducción olfatoria, gustativa y fototransductora (Boudes y Scamps, 2012; Hartzell et al., 2005; Kamaledin, 2017; Liu et al., 2021; Vocke et al., 2013). Los canales CaCC se activan por un incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que va de 0.250 a 1  $\mu\text{M}$ , este incremento ocurre por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales permeables a este ion, dentro de los que se encuentran los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por almacenamiento (SOC), los dependientes de voltaje (VDCC) y los canales TRPV1; o bien, mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares (retículo endoplásmico), como resultado de la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y la producción de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) dependiente de la fosfolipasa C (PLC) (**Figura 6**) (Ferrera et al., 2010; Scott et al., 1995). El movimiento de  $\text{Cl}^-$  a través de los canales CaCC está determinado por tres factores básicos: (1) el potencial de membrana, (2) el gradiente de concentración de  $\text{Cl}^-$  y (3) la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Hartzell et al., 2005). Por lo que la apertura de este tipo de canales genera una entrada o salida de  $\text{Cl}^-$  dependiendo de la diferencia entre el potencial de equilibrio de  $\text{Cl}^-$  y el potencial de membrana en



reposo (Ferrera et al., 2010), en donde además, estos factores biofísicos dependen en parte del tipo celular (Ferrera et al., 2011). Anteriormente, se propusieron varios candidatos para formar parte de los canales CaCC, sin embargo, a la fecha solo dos familias de proteínas cumplen con las propiedades de canal CaCC, las anoctaminas y las bestrofinas (Huang et al., 2012; Kunzelmann et al., 2009).



**Figura 6. Mecanismo de activación de canales de cloruro activados por calcio.** Los canales CaCC son activados por incrementos del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico provenientes de la entrada de este ion a través de canales ubicados en la membrana celular o por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares. Modificado de (Ferrera et al., 2010).

### 1.6.1. Anoctaminas

La familia de proteínas anoctaminas (Ano), también llamadas TMEM16, está compuesta por 10 miembros que comparten una alta homología de secuencia con funciones diversas (Picollo et al., 2015). Anoctamina-1 (TMEM16A) y anoctamina-2 (TMEM16B) son canales de conductancia a iones  $\text{Cl}^-$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) (Cho et al., 2012; Hartzell et al., 2005; Kamaledin, 2017; Scott et al., 1995; Vocke et al., 2013; Yang et al., 2008), anoctamina 4 (TMEM16D), anoctamina 5 (TMEM16E), anoctamina 6



(TMEM16F), anoctamina 9 (TMEM16J) y anoctamina 10 (TMEM16K) participan en el transporte de fosfolípidos hacia la membrana plasmática (escramblasas), con una activación igualmente dependiente a  $\text{Ca}^{2+}$  (Agostinelli y Tammaro, 2022; Boudes y Scamps, 2012; Ferrera et al., 2011; Hawn et al., 2021); mientras que anoctamina 3 (TMEM16C), anoctamina 7 (TMEM16G) y anoctamina 8 (TMEM16H), además de ser escramblasas, funcionan como subunidades auxiliares de otros canales (Agostinelli y Tammaro, 2022; Al-Hosni et al., 2022; Picollo et al., 2015). Estructuralmente, las anoctaminas forman homodímeros y constan de diez segmentos transmembranales con los extremos amino y carboxilo en la región intracelular (Al-Hosni et al., 2022; Hawn et al., 2021; Nguyen y Chen, 2022). El sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  se localiza entre los segmentos TM6 y TM8 (Nguyen y Chen, 2022), mientras que los segmentos TM3 a TM8 forman el poro conductor del canal (Hawn et al., 2021). La afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  depende de la variante generada por splicing alternativo del ARNm precursor de TMEM16 (a, b, c, d) (Ferrera et al., 2009) (**Figura 7**). Además, la activación de las anoctaminas muestra dependencia al voltaje (Nguyen y Chen, 2022). Sin embargo, esto no es homogéneo en todos los tipos, debido a que algunas muestran una mayor afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , unión más rápida y disociación más lenta a potenciales de membrana más despolarizados (Xiao et al., 2011), mientras que otras necesitan una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y parecen no depender del voltaje (Ferrera et al., 2009).

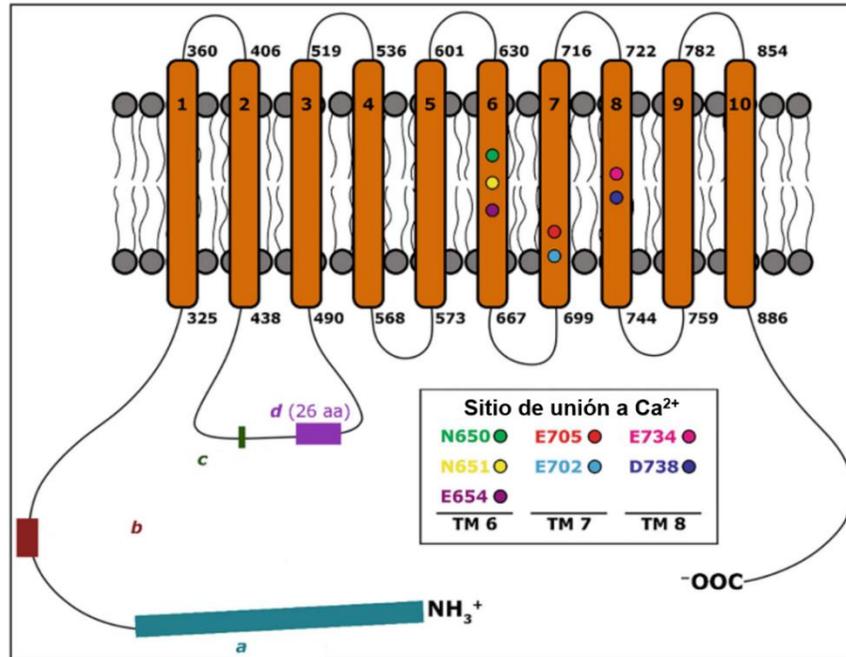


Figura 7. Estructura de las proteínas anoctaminas. Modificado de (Nguyen y Chen, 2022).

### 1.6.2. Bestrofinas

Las bestrofinas (Best), son una familia de proteínas de membrana plasmática codificadas por el gen *VMD2*, también conocido como *BEST1* en el cromosoma 11q13, identificadas por primera vez a través de mutaciones en este gen que lo relacionaron con la distrofia macular viteliforme de Best (BVDM, por sus siglas en inglés) (Johnson et al., 2017; Park et al., 2009; Sun et al., 2002; Tsunenari et al., 2003).

Bestrofina-1 (Best1) es un CaCC que se encuentra altamente expresado en el epitelio pigmentario de la retina, en donde su disfunción se ha asociado con distintas enfermedades degenerativas de la retina conocidas como bestrofinopatías (Grewal et al., 2021; Owji et al., 2021; Yang et al., 2014). No obstante, su expresión también se ha reportado en casi todos los tipos celulares dentro de los que se incluyen estructuras como las vías respiratorias, colon, SNC, riñón, e importante en los testículos, desempeñando funciones diversas como la fototransducción, transducción olfativa, excitabilidad neuronal, modulación de la secreción de fluidos y contracción del



músculo liso (Marmorstein y Kinnick, 2007; NCBI, 2023; Oh y Lee, 2017; Sun et al., 2002). A la fecha se ha identificado que el genoma humano codifica 4 bestrofinas: *BEST1* (*VMD2*), *BEST2* (*VMD2L1*), *BEST3* (*VMD2L2*) y *BEST4* (*VMD2L3*) (Krämer et al., 2004).

Estructuralmente, las bestrofinas forman un pentámero y se caracterizan por presentar un extremo amino terminal altamente conservado, un extremo carboxilo terminal variable, en donde ocurren interacciones proteína-proteína que regulan a los canales, ambos localizados en el lado citoplasmático, y cuatro hélices transmembranales (Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014). Existen bucles extracelulares entre las hélices TM1-TM2 y TM3-TM4 que son cortos, en tanto, el bucle intracelular entre TM2-TM3 es largo y contiene un dominio citoplasmático separado de cinco hélices ( $\alpha 3$ - $\alpha 7$ ) y la hélice del extremo carboxilo terminal ( $\alpha 10$ ) (**Figura 8**) (Yang et al., 2014). Las hélices TM2 de cada protómero del pentámero recubre al poro conductor de iones y el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  se localiza en el dominio carboxilo terminal, inmediatamente después de la hélice TM4, en donde se encuentra una secuencia de aminoácidos característica, conocida como “grupo ácido” (Glu300, Asp301, Asp302, Asp303 y Asp304) (Dickson et al., 2014; Grewal et al., 2021; Johnson et al., 2017; Kranjc et al., 2009; Miller et al., 2019; Xiao et al., 2010; Yang et al., 2014). Si bien se ha descrito a bestrofina-1 como un canal que permea principalmente  $\text{Cl}^-$ , existen reportes de que este canal también es altamente permeable a otro tipo de moléculas como  $\text{HCO}_3^-$ , glutamato y GABA, lo que le confiere una participación potencial en procesos de regulación de pH y liberación de neurotransmisores (Dickson et al., 2014; Grewal et al., 2021; Oh y Lee, 2017; Owji et al., 2021; Xiao et al., 2008).

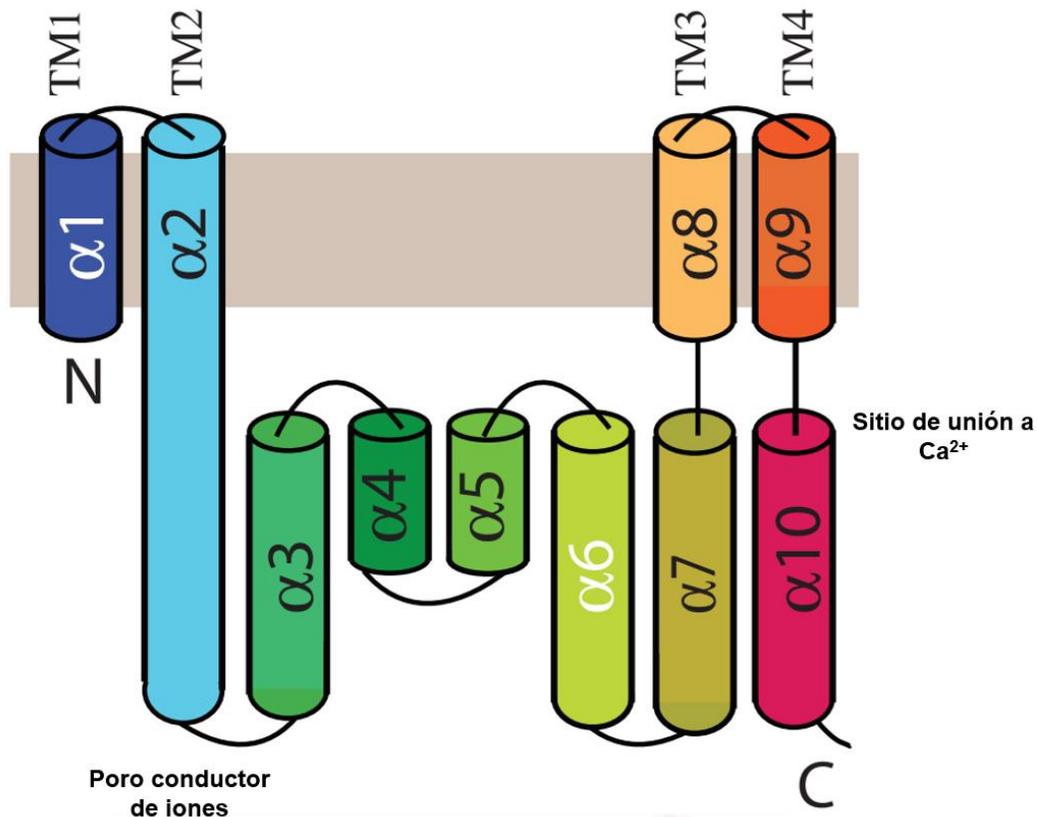


Figura 8. Estructura de las proteínas bestrofinas. Modificado de (Yang et al., 2014).

### 1.7. Participación de los canales de cloruro activados por calcio en la nocicepción

Las neuronas del GRD y de la médula espinal expresan canales CaCC (Yang et al., 2008), que participan como reguladores del dolor agudo y crónico (Park et al., 2009; Tsunenari et al., 2003). Debido a las condiciones particulares del potencial de inversión a  $\text{Cl}^-$  de la fibra aferente primaria, su activación conduce a la salida de  $\text{Cl}^-$ , induciendo despolarización membranal e incrementando la excitabilidad en neuronas sensoriales durante el dolor inflamatorio y neuropático (Boudes y Scamps, 2012; Cho et al., 2012; Lee et al., 2014; Salzer y Boehm, 2019).

En el caso de anoctamina-1, se ha reportado que en neuronas del GRD, la aplicación de rampas de calor induce una despolarización dependiente de este



canal, mientras que, su eliminación disminuye los comportamientos pronociceptivos inducidos por estímulos térmicos (Cho et al., 2012). En GRD, anoctamina-1 colocaliza con el receptor TRPV1 (Cho et al., 2012). Igualmente, se ha reportado que anoctamina-1 incrementa la excitabilidad neuronal en el GRD en condiciones inflamatorias o neuropáticas (Lee et al., 2014). En dolor inflamatorio se ha determinado que el pretratamiento intratecal y periférico de un bloqueador no selectivo, el ácido niflúmico (NFA), y de un bloqueador selectivo de los CaCC, el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ , revierte las conductas nociceptivas agudas, así como la alodinia mecánica e hiperalgesia, inducidas por formalina al 1% en la rata (García et al., 2014).

Aunado a lo anterior, la aplicación de bloqueadores de CaCC no selectivos como el ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB), ácido antraceno-9-carboxílico (9-AC) y el NFA, así como bloqueadores para anoctamina-1 y bestrofina-1 ( $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$  y  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ ) reducen la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica en el dolor neuropático inducido por la ligadura de nervios espinales L5/L6 (LNE) (Pineda-Farías et al., 2015). Reforzando estos hallazgos, el bloqueo de anoctamina-1, mediante los bloqueadores  $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$  y MONNA, reduce el dolor neuropático en un modelo inducido por la LNE, pero no por la transección del nervio espinal L5 (TNE), lo que sugiere que la participación de anoctamina-1 en el dolor neuropático depende del tipo de lesión que genere el dolor neuropático (García et al., 2018).

Bestrofina-1 también ha sido relacionado con un papel en la transmisión nociceptiva en el dolor neuropático (Pineda-Farías et al., 2015), además existen reportes de un posible papel en procesos de regeneración de neuronas sensoriales posterior a lesiones de fibras nerviosas. Por ejemplo, se ha reportado que la axotomía del nervio ciático aumenta la expresión de bestrofina-1 e induce corrientes mediadas por CaCC en neuronas de mediano y gran tamaño (André et al., 2003; Al-Jumaily et al., 2007; Boudes y Scamps, 2012).



## 1.8. Estrógenos y señalización estrogénica

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas que incluyen al  $17\beta$ -estradiol, estrona, estriol y estrerol (Cornil et al., 2015; Hwang et al., 2021; Yaşar et al., 2016). Los estrógenos se sintetizan por aromatización de sustratos androgénicos mediante la acción de la enzima aromatasa. Estas hormonas se producen principalmente en los ovarios, pero también en testículos y diversos tejidos extragonadales como el tejido adiposo, glándulas suprarrenales, músculo liso, hígado, corazón, endotelio vascular y cerebro. Allí, los estrógenos desempeñan importantes funciones como la regulación de la reproducción femenina, regulación de la homeostasis esquelética, metabolismo de lípidos y mantenimiento de la densidad ósea (Biason-Lauber y Lang-Muritano, 2022; Cornil et al., 2006; Cui et al., 2013; Knowlton y Lee, 2012). Estos efectos celulares se encuentran mediados principalmente por la señalización estrogénica dada por la interacción de estas hormonas con sus diferentes receptores. Los receptores de estrógenos son proteínas ampliamente distribuidas en distintos tipos celulares. A la fecha se han descrito dos tipos: los receptores intracelulares que incluyen al receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y al receptor de estrógenos beta ( $ER\beta$ ), y los receptores membranales de estrógeno 1 acoplado a proteína G (GPER1) (Biason-Lauber y Lang-Muritano, 2022; Cornil et al., 2006; Fuentes y Silveyra, 2019; Hwang et al., 2021; Yaşar et al., 2016).

Los mecanismos de señalización estrogénica se dividen en mecanismos genómicos y no genómicos (**Figura 9**):

**Señalización genómica directa:** este tipo de señalización es conocida como el mecanismo clásico. Aquí, los receptores intracelulares de estrógenos  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  funcionan como factores de transcripción activados por ligandos que estimulan o reprimen la transcripción génica. Los estrógenos al ser hormonas esteroideas pueden ingresar a través de la membrana plasmática e interactuar con los  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , esto induce un cambio conformacional que permite la dimerización del receptor. Una vez dimerizado, el receptor se transloca al



núcleo donde recluta maquinaria transcripcional y cofactores para secuencias diana de ADN específicas denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE) de promotores con genes susceptibles a la regulación por estrógeno (Cui et al., 2013; Fuentes y Silveyra, 2019; Yaşar et al., 2016).

**Señalización genómica indirecta:** los estrógenos tienen la capacidad de regular diversos genes que no contienen ERE en sus regiones promotoras, sin la unión directa de los ER al ADN. Esto lo realizan a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción como la proteína estimulante 1 (SP-1), proteína activadora 1 (AP-1), NF- $\kappa$ B y c-jun (Björnström y Sjöberg, 2005; Cui et al., 2013; Fuentes y Silveyra, 2019).

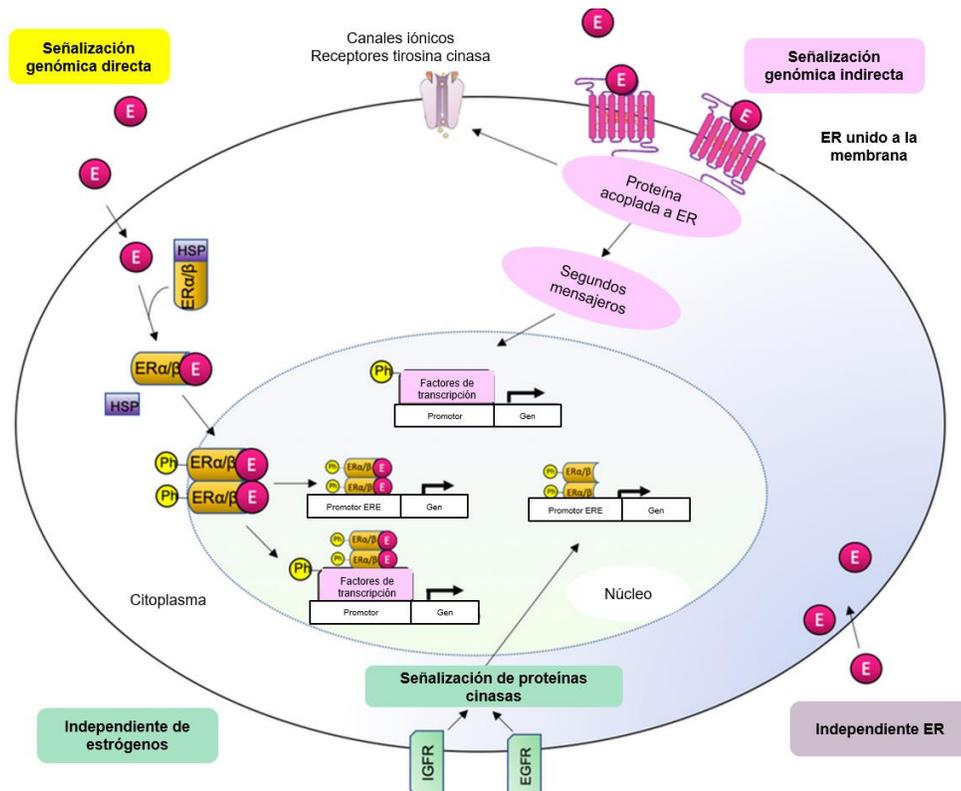
**Señalización no genómica indirecta:** esta vía es la responsable de las acciones estrogénicas rápidas que no requieren la transcripción directa de genes diana. En esta vía participan los receptores membranales GPER1, pero también ER $\alpha$  y ER $\beta$  localizados en la membrana. Los receptores membranales regulan estos efectos rápidos a través de la diafonía con otros receptores membranales o la participación de mecanismos transduccionales como la activación de diversas cinasas como PLC/PKC, Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt y AMPc/PKA, que dan como resultado cambios indirectos en la expresión génica. Estas cinasas fosforilan factores de transcripción, lo que modifica su capacidad para unirse a secuencias genómicas. Algunos factores de transcripción susceptibles a la regulación estrogénica incluyen a Elk-1, CREB y NF- $\kappa$ B (Björnström y Sjöberg, 2005; Cui et al., 2013; Fuentes y Silveyra, 2019; Hwang et al., 2021).

**Señalización independiente del ligando:** a nivel fisiológico los ER pueden activarse en ausencia de estrógenos, por diversas moléculas como la dopamina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y activadores de vías de transducción que involucran a las cinasas PKA, PKC, MAPK. Esta activación independiente del ligando se relaciona con la



fosforilación de residuos específicos en los propios receptores lo que activa su función transcripcional (Cui et al., 2013; Fuentes y Silveyra, 2019).

**Señalización independiente de ER:** los estrógenos ejercen efectos antioxidantes en una vía que no requiere la participación de los ER. Esto lo realizan regulando actividades enzimáticas e interactuando con otros receptores para disminuir daños celulares (Cui et al., 2013).



**Figura 9. Vías de señalización estrogénicas.** Señalización genómica directa: los estrógenos se unen a los ER, el complejo se dimeriza y transloca al núcleo lo que induce cambios transcripcionales en genes susceptibles a regulación estrogénica con o sin ERE. Señalización genómica indirecta: los receptores membranales inducen cambios transduccionales. Señalización independiente de ER: los estrógenos modulan efectos antioxidantes de manera independiente de ER. Señalización independiente de estrógenos: se producen eventos genómicos en ausencia de los estrógenos, por fosforilación de los ER. Modificado de (Fuentes y Silveyra, 2019).



### 1.9. Dimorfismo sexual y dolor

Diversos estudios epidemiológicos indican que existe una mayor prevalencia de dolor crónico como dolor de espalda, dolor musculoesquelético, dolor de cabeza y artritis en mujeres (Filligim et al., 2009; Mogil, 2012; Ruau et al., 2012). Asimismo, estudios basados en pruebas sensoriales en adultos sanos indican una mayor sensibilidad al dolor con distintos estímulos en las mujeres, así como un menor umbral al dolor (Filligim et al., 2009; Mogil, 2012; Rolke et al., 2006). En los últimos años cada vez se acepta más que el sexo constituye una variable biológica sumamente relevante en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico, por lo cual la dilucidación de los mecanismos que dan origen a estas diferencias pudieran mejorar el manejo clínico del dolor (Filligim et al., 2009; Greenspan et al., 2010).

Cada vez existe más evidencia de que algunos de los mecanismos que subyacen al dolor son sexualmente dimórficos (Saghaei et al., 2013; Vacca et al., 2014; Yamagata et al., 2016). En condiciones de dolor crónico en ratones se ha descrito que a nivel de la médula espinal los ratones macho y hembra reclutan diferentes células del sistema inmune (Mapplebeck et al., 2017; Rosen et al., 2017; Sorge et al., 2015; Sorge y Totsch, 2017). En el caso de ratones macho depende de la participación microglial, mientras que en el caso de ratones hembra se requieren los linfocitos T (Sorge et al., 2015). Asimismo en un modelo de lesión cerebral cortical se encontró una mayor densidad de células inmunorreactivas a Iba1 (marcador microglial) en ratones macho a comparación de los ratones hembra, además de una mayor expresión de la quimiocina CCL2, lo que se traduce en un mayor reclutamiento microglial posterior a la lesión en los machos (Acaz-Fonseca et al., 2015).

En otro estudio se reportó que en un modelo de inflamación periférica la administración del adyuvante completo de Freund (CFA) en el GT incrementó la expresión del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en ratones hembra pero no en ratones macho. Mientras que, la inflamación



periférica del GT aumentó las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y BDNF en ratones macho, comparado con ratones hembra (Kuzawińska et al., 2014).

Particularmente, esta diferencia en la percepción dolorosa entre hembras y machos también se ha relacionado a la presencia de hormonas gonadales, especialmente los estrógenos, como el 17 $\beta$ -estradiol. Los estrógenos se han propuesto como hormonas que participan en la modulación de la nocicepción tanto a nivel de los GRD como en la médula espinal (Saghaei et al., 2013; Vacca et al., 2014). Sin embargo, los reportes de la participación de los estrógenos en el dolor son contradictorios debido a que algunos estudios reportan que estas hormonas incrementan la alodinia e hiperalgesia en algunos modelos de dolor y en contraparte algunos otros estudios validan que los estrógenos permiten un efecto antinociceptivo (Ren y Wu, 2012). Por ejemplo, se ha reportado que ratas ovariectomizadas tienden a presentar hiperalgesia térmica y mecánica (Chen et al., 2021), mientras que, se ha descrito que la suplementación con estrógenos es capaz de revertir este tipo de conductas (Zhang et al., 2020). También se ha descrito que el bloqueo de los receptores a estrógenos disminuye el umbral de retiro mecánico (Hall et al., 2001).

Respecto al dolor neuropático se ha reportado que, en ratones con constricción crónica del nervio ciático, los ratones macho presentaron una disminución gradual de la alodinia y se recuperaron 81 días posteriores a la cirugía, mientras que, en el caso de los ratones hembra la alodinia persistió después de los 121 días postcirugía, sugiriendo mecanismos de mantenimiento y recuperación diferenciales de acuerdo al sexo en este tipo de dolor (Vacca et al., 2014).

En el dolor neuropático inducido por la LNE, las conductancias a Cl<sup>-</sup> se han reportado como mecanismos que pueden participar en la percepción dolorosa diferencial, por ejemplo, se reportó que el efecto antialodínico producido por L-655,708, un agonista inverso del receptor GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 5, solo se presenta en ratas hembra y que su acción depende de la presencia de estradiol y de la activación



de su receptor  $ER\alpha$  (Franco-Enzástiga et al., 2021). De igual manera, en el caso del receptor  $GABA_A-\alpha6$  se ha reportado que la activación del receptor por un modulador alostérico positivo (PZ-II-029) solo se observa en ratas hembra y no en macho (Rodríguez-Palma et al., 2022). Estos datos sugieren que los mecanismos neurobiológicos subyacentes al dolor neuropático pueden ser diferentes en animales hembra o macho.



## 2. JUSTIFICACIÓN

El dolor neuropático se considera como un tipo de dolor debilitante que produce un impacto negativo en la calidad de vida (Torrance et al., 2006). No obstante, a pesar de los importantes avances en el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que dan origen a esta patología, las alternativas terapéuticas continúan siendo limitadas (Keilani et al., 2018; Mills et al., 2019; Szok et al., 2019).

La evidencia experimental sugiere que los mecanismos neurobiológicos que subyacen al establecimiento y mantenimiento del dolor neuropático pueden ser diferentes en animales hembra y macho; en particular, las conductancias de Cl<sup>-</sup> mediadas por los receptores extrasinápticos GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 5 y GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 6 (Franco-Enzástiga et al., 2021; Rodríguez-Palma et al., 2023).

Los CaCC anoctamina-1 y bestrofina-1, expresados en neuronas del GRD y médula espinal, son canales con un papel pronociceptivo y contribuyen al mantenimiento del dolor neuropático (García et al., 2018; Pineda-Farias et al., 2015). Sin embargo, no existen estudios que hayan analizado la posible regulación diferencial por 17 $\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa, y si este mecanismo también contribuye al dimorfismo sexual observado en el dolor de tipo neuropático. Por tal razón, el estudio de la regulación de estos canales aportará conocimiento al entendimiento de las diferencias sexuales en el dolor y con ello mejorar los tratamientos farmacológicos disponibles.



### **3. HIPÓTESIS**

Los canales de cloruro activados por calcio (CaCC), bestrofina-1 y anoctamina-1 se regulan al alta por  $17\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa en ratas hembra con dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5/L6 o por la transección del nervio espinal L5.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los canales de cloruro activados por calcio (CaCC), bestrofina-1 y anoctamina-1, se regulan al alta por  $17\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa en ratas hembra con dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5/L6 o por la transección del nervio espinal L5.

#### **4.1. Objetivos específicos**

1. Evaluar farmacológicamente si bestrofina-1 y anoctamina-1 tienen una participación diferencial en ratas hembra y macho con dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5/L6 o por la transección del nervio espinal L5.
2. Determinar si el  $17\beta$ -estradiol modifica la función de bestrofina-1 en ratas hembra con transección del nervio espinal L5.
3. Evaluar si la regulación de bestrofina-1 por  $17\beta$ -estradiol depende de la activación del receptor de estrógenos alfa en ratas hembra con transección del nervio espinal L5.
4. Determinar la expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en el ganglio de la raíz dorsal y en la médula espinal dorsal de ratas hembra y macho con dolor neuropático.
5. Determinar si la expresión proteica de bestrofina-1 en el ganglio de la raíz dorsal y en la médula espinal dorsal se regula al alta por  $17\beta$ -estradiol en ratas hembra con dolor neuropático.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra o macho de la cepa Wistar con un peso entre 60 a 80 g y 120 a 140 g. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Cinvestav-Sede Sur y se mantuvieron en condiciones estándar con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, así como condiciones ambientales controladas (19-23 °C). El manejo de los animales y los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité para el manejo de animales de laboratorio de Cinvestav-Sede Sur (0095-14) y se siguieron las guías de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### 5.1. Ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 (LNE y TNE)

La cirugía para la ligadura de nervios espinales L5/L6 (LNE) se realizó de acuerdo con el método descrito previamente (Kim y Chung, 1992). En resumen, los animales se anestesiaron con ketamina y xilazina (50 y 10 mg/kg, respectivamente) por vía intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, se realizó una incisión en el dorso y se expuso la columna vertebral; a continuación, se retiró el foramen transverso y los nervios L5 y L6 del lado izquierdo se ligaron con sutura de seda 6-0. En la cirugía de transección del nervio espinal L5 (TNE) se ligó el nervio L5 y se realizó un corte a 2 mm distales de la ligadura hacia la periferia (Li et al., 2000). Además, se contó con un grupo de ratas falsamente operadas (sham), a las que se les realizó la cirugía y exposición de nervios, pero estos no fueron ligados o cortados.

### 5.2. Ovariectomía

La ovariectomía (OVX) se realizó de acuerdo con el método descrito previamente (Hernandez-Leon et al., 2018). Brevemente, los animales se anestesiaron con ketamina y xilazina (50 y 10 mg/kg, respectivamente) por vía i.p. Enseguida se extrajeron los ovarios de la cavidad abdominal central inferior



mediante una incisión en el área ventral. Se permitió a los animales un tiempo de recuperación de 14 días.

### 5.3. Evaluación de la conducta nociceptiva

La evaluación de las conductas de retiro ante estímulos mecánicos se realizó mediante la aplicación de filamentos calibrados de von Frey, con base en el método *up and down* (Chaplan et al., 1994), para calcular el 50% de umbral de retiro. Para esto, las ratas se colocaron en cajas de acrílico con piso de malla metálica, facilitando un tiempo de habituación de 25 minutos. Enseguida, se inició la prueba utilizando los filamentos que se encuentran en el rango de 0.4 a 15 g, comenzando con el filamento de 2 g sobre la superficie plantar de los miembros posteriores, aplicando un estímulo por aproximadamente 10 segundos. El retiro brusco de la pata durante la aplicación del estímulo se consideró como una respuesta positiva y se continuó con la aplicación del filamento anterior, en contraparte la ausencia de retiro se consideró como una respuesta negativa y se continuó con el filamento posterior. Una vez obtenido el primer cambio en el patrón de respuestas se realizaron 5 evaluaciones adicionales hasta completar 6 datos a partir de los cuales se calculó el 50% del umbral de retiro empleando la siguiente fórmula:

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

Donde:

Xf: valor del último filamento de von Frey utilizado

K: factor de corrección indicado en la tabla de (Dixon, 1980) para el patrón de respuestas positivas o negativas

δ: diferencia promedio entre estímulos

El 50% del umbral de retiro se interpretó como la intensidad de estímulo requerido para generar una respuesta positiva en el 50% de las aplicaciones de estímulos en cada animal (Chaplan et al., 1994).



## 5.4. Fármacos

El bloqueador selectivo de los canales CaCC, el CaCC<sub>inh-A01</sub> (ácido 6-(1,1-dimetiletil)-2-[(2-furanilcarbonil) amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Cat. SML0916; St Louis Mo, EUA).

El bloqueador selectivo del canal anoctamina-1, el T16A<sub>inh-A01</sub> (2-[(5-etil-1,6-dihidro-4-metil-6-oxo-2-pirimidinil) tio]-N-[4-(4-metoxifenil)-2-tiazolil] acetamida) se obtuvo de Cayman (Cat. 18518; Ann Arbor, Michigan, EUA). Ambos fármacos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 30%.

El benzoato de 17 $\beta$ -estradiol (E2) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Cat. E8875; St Louis Mo, EUA) y se disolvió en aceite de ajonjolí.

El antagonista selectivo de los receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ), el MPP (1,3-bis (4-hidroxi-fenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoxi) fenol]-1Hpirazol dicloruro) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Cat. M7068; St Louis Mo, EUA) y se disolvió en DMSO al 5%.

El agonista selectivo de los ER $\alpha$ , el PPT (1,3,5-Tris(4-hidroxi-fenil)-4-propil-1Hpirazol) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-297946, Dallas, TX, EUA) y se disolvió en DMSO al 1%.

## 5.5. Administración intratecal de fármacos

Los animales se anestesiaron con isoflurano para realizar la administración intratecal de los fármacos en un volumen final de 10  $\mu$ L utilizando jeringas de 0.5 mL con aguja de 31 G x 8 mm que fueron introducidas en el foramen vertebral, entre las vértebras L5 y L6.

## 5.6. Inmunodetección mediante Western blot

### 5.6.1. Extracción y procesamiento de proteínas

Los animales se sacrificaron y la porción dorsal de la médula espinal, así como los ganglios de la raíz dorsal en la médula espinal L4 y L5 se obtuvieron del



lado ipsilateral a la lesión. Los tejidos se homogenizaron a 4 °C utilizando solución amortiguadora de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 1%, pH 7.5), inhibidores de fosfatasa en proporción 1:100 de soluciones stock ( $\beta$ -glicerol 5 mM, NaF 50 mM, PMSF 100 mM, ortovanadato 280 mM), inhibidores de proteasas en proporción 1:1000 (pepstatina 2 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 2 mg/mL) y sacarosa 1.5 M al 1%. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 13500 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante.

### **5.6.2. Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (BioRad Laboratories Inc; Hercules, CA). En donde 1  $\mu$ L de cada muestra se disolvió en proporción 1:20 con solución amortiguadora RIPA y posteriormente se agregaron 250  $\mu$ L de reactivo de Bradford diluido en proporción 1:5 con agua destilada. Enseguida, se permitió un tiempo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 595 nm.

### **5.6.3. Western blot**

Se utilizaron 50  $\mu$ g de proteínas totales de cada muestra para realizar la electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Posteriormente, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual fue bloqueada previamente con leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM) y Tween 20 0.1% (PBS-T) durante 1 h. Enseguida, las membranas se incubaron durante 12 h a 4 °C con el anticuerpo primario para anoctamina-1 (1:200; Cat. ACL-011, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), bestrofina-1 (1:500; Cat. ABC-001, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) o ER $\alpha$  (1:500; Cat. sc-542, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) en PBS-T. Transcurrida la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por un



período de 10 minutos con leche descremada al 1% en PBS-T. El anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:3000; Cat. SC-2370, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) se incubó por 1 h y se continuó con 3 lavados de 10 minutos con leche descremada al 1% en PBS-T. La inmunodetección de proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia (Immobilon western chemiluminescent HRP substrate; Millipore; Burlington, MA) y las imágenes obtenidas con el equipo C-Digit blot scanner (LI-COR Biosciences; Lincoln, NE) se analizaron con el software Image Studio 5.2 (LI-COR Biosciences; Lincoln, NE) para la cuantificación de la densidad óptica de la señal. Asimismo, la proteína  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga, empleando el anticuerpo primario para actina (1:10000; Cat. GTX629630; GeneTex; Irvine, CA) y el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10000; Cat. 115-035-003; Jackson Immuno Research Laboratories; West Grove, PA).

### 5.7. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar medio (EEM). Los datos obtenidos de dos grupos se compararon utilizando la prueba *t de Student*. Los datos de tres o más grupos se compararon mediante el análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA), seguido de una prueba post hoc de Dunnett o Tukey. El criterio de significancia estadística fue  $p < 0.05$ . Todos los datos estadísticos se analizaron en el programa GraphPad Prism 8. Los grupos experimentales fueron conformados por un total de 6 animales, excepto cuando se indique de otra manera.



## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1. Participación de bestrofina-1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por la LNE o TNE en ratas hembra y macho

Para determinar la participación de bestrofina-1 y anoctamina-1 en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por la LNE o TNE, ratas hembra y macho se administraron por vía intratecal (i.t.) con el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  (0.1, 1 y 10  $\mu\text{g}$ ), el  $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$  (0.1, 1 y 10  $\mu\text{g}$ ) o vehículo (DMSO al 30%), 14 días posteriores a la lesión de los nervios espinales y se evaluó el umbral de retiro ante estímulos mecánicos por 8 h posteriores a la administración (**Figura 10**).

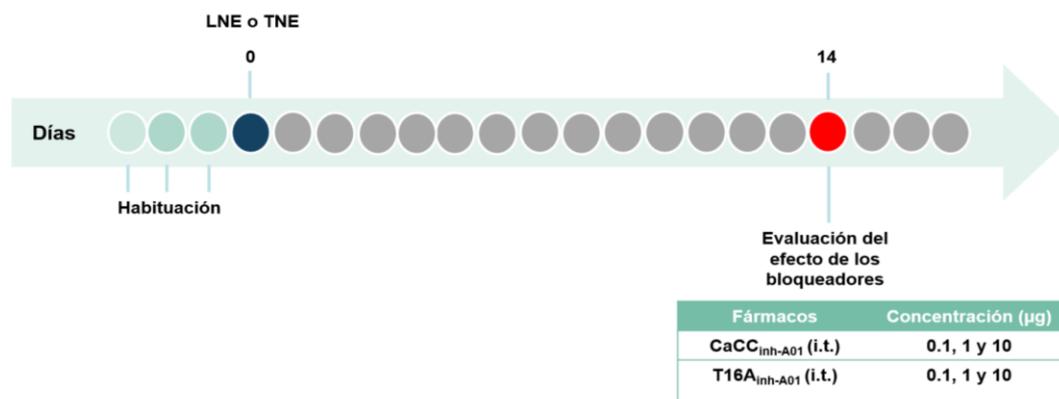


Figura 10. Diseño experimental de la participación de bestrofina-1 y anoctamina-1 en la alodinia táctil inducida por la LNE o TNE en ratas hembra y macho.

### 6.2. Regulación de bestrofina-1 por $17\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE

Para determinar si la actividad de bestrofina-1 es regulada por hormonas gonadales en ratas hembra, ratas hembra fueron sujetas a ovariectomía (OVX). Tras 14 días de recuperación, se realizó la TNE y 14 días posteriores a la cirugía se evaluó el efecto del bloqueador  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  (0.1 y 1  $\mu\text{g}$ , i.t.) sobre la alodinia táctil inducida por la lesión de los nervios espinales (**Figura 11**).

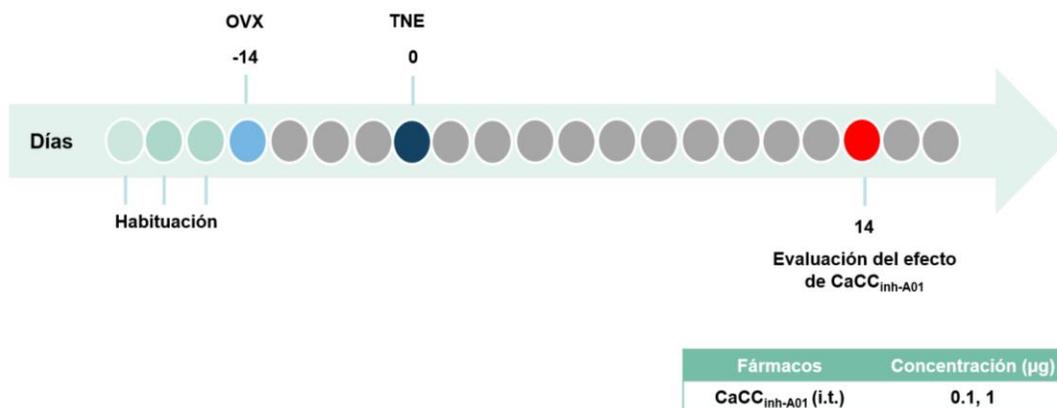


Figura 11. Diseño experimental de la regulación de bestrofina-1 en ratas hembra ovariectomizadas con TNE.

Para determinar si la actividad de bestrofina-1 se regula por  $17\beta$ -estradiol (E2) en ratas hembra, ratas sujetas a OVX y con TNE, se administraron con una dosis diaria de  $17\beta$ -estradiol (20 µg/kg) o su vehículo (aceite de ajonjolí) iniciando al día siguiente de la lesión de los nervios espinales y por un total de 13 días. El día posterior a la última administración de  $17\beta$ -estradiol se evaluó el efecto del bloqueador CaCC<sub>inh</sub>-A01 (0.1 y 1 µg, i.t.) sobre la alodinia táctil inducida por la lesión de los nervios espinales (**Figura 12**).

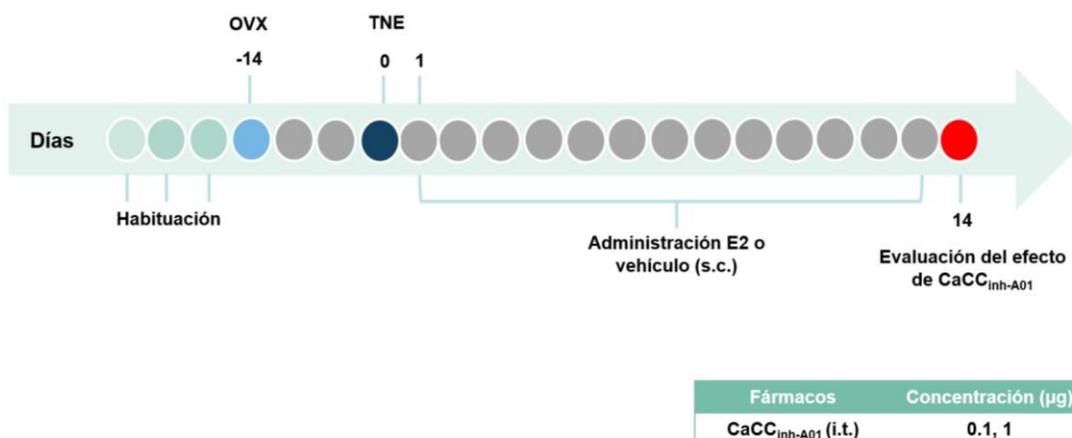


Figura 12. Diseño experimental de la regulación de bestrofina-1 por  $17\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE.



### 6.3. Participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE

Para determinar si el 17 $\beta$ -estradiol modula la actividad de bestrofina-1 a través de su interacción con los receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ), ratas sujetas a OVX y con TNE se administraron con una dosis diaria de 17 $\beta$ -estradiol (20  $\mu$ g/kg) durante 13 días. Al día 11 se administró también de manera i.t. el antagonista selectivo de ER $\alpha$ , MPP (0.5  $\mu$ g) por 3 días. El día posterior a la última administración de MPP y 17 $\beta$ -estradiol, las ratas se administraron con el CaCC<sub>inh-A01</sub> (1  $\mu$ g, i.t.) y se evaluó su efecto sobre la alodinia táctil inducida por la lesión de los nervios espinales (**Figura 13**).

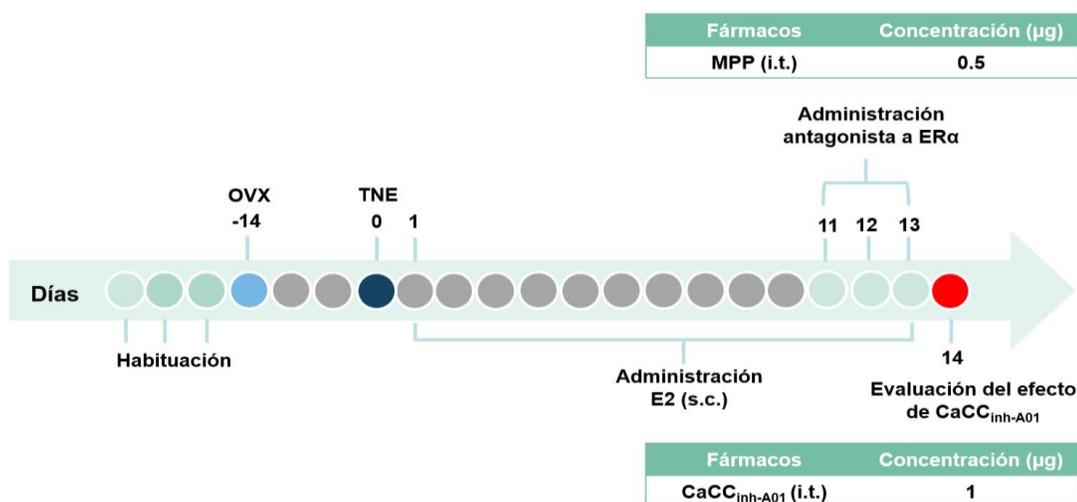


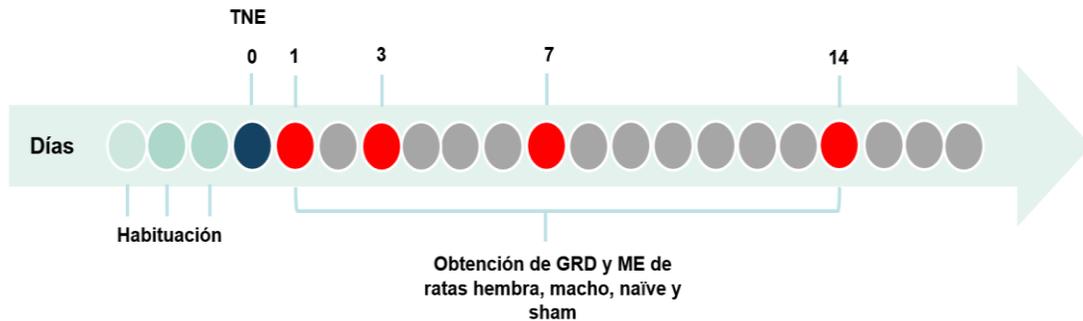
Figura 13. Diseño experimental de la participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE.

### 6.4. Expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en GRD y médula espinal de ratas hembra y macho con TNE

Para determinar si la TNE modifica la expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en ratas hembra y macho, se obtuvieron los GRD (L4 y L5) y médula espinal dorsal a nivel de L5 del lado ipsilateral a la lesión de los nervios espinales, a los días 1, 3, 7 y 14 posteriores a la cirugía, así como un grupo



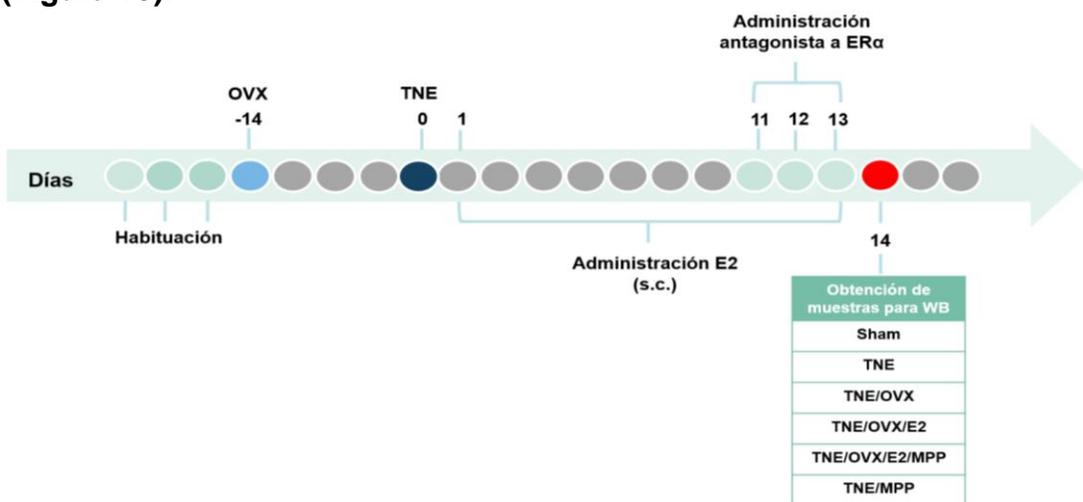
naïve y un grupo sham, para su posterior análisis mediante la técnica de western blot (**Figura 14**).



**Figura 14.** Diseño experimental de la expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en GRD y médula espinal de ratas hembra y macho con TNE.

### 6.5. Regulación de la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa en GRD y médula espinal por 17 $\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE

Para determinar si la expresión proteica de bestrofina-1 y ER $\alpha$  en ratas hembra con TNE se regula por 17 $\beta$ -estradiol a través de su receptor ER $\alpha$ , se obtuvieron los GRD y médula espinal de ratas hembra con OVX, OVX/E2, OVX/E2/MPP, TNE/MPP y sham a los días 14 posteriores a la lesión de los nervios espinales para su posterior análisis mediante la técnica de western blot (**Figura 15**).



**Figura 15.** Diseño experimental de la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa en GRD y médula espinal de ratas hembra con TNE.



## 6.6. Participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 en ratas macho con TNE

Para determinar si la activación de los ER $\alpha$  favorece la presencia del efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1  $\mu$ g) en ratas macho con TNE, se administró PPT (0.05 y 0.5  $\mu$ g, i.t.), agonista selectivo de ER $\alpha$  por 3 días consecutivos a partir del día 11 post-lesión. El día posterior a la última administración de PPT se evaluó el efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1  $\mu$ g, i.t.) sobre la alodinia táctil inducida por la TNE (**Figura 16**).

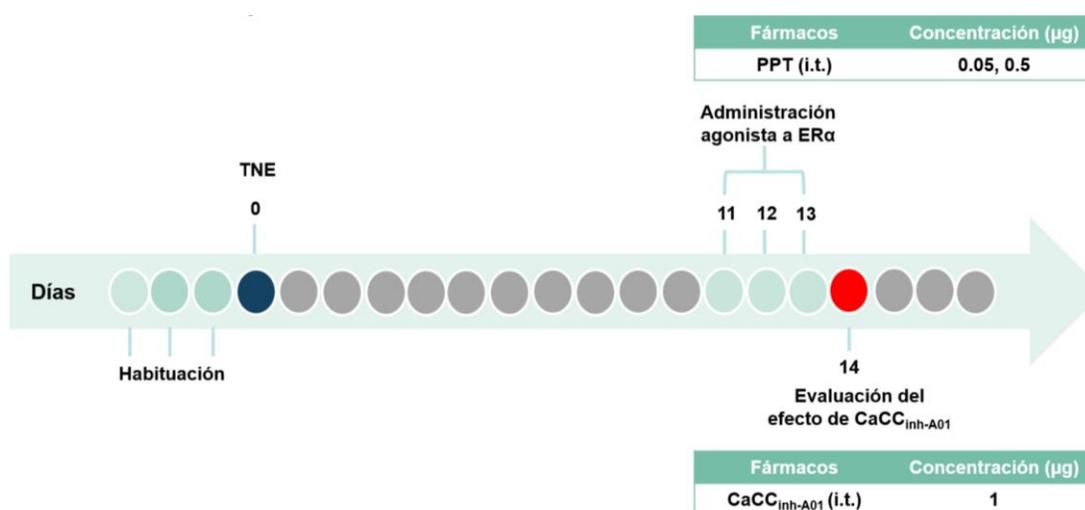


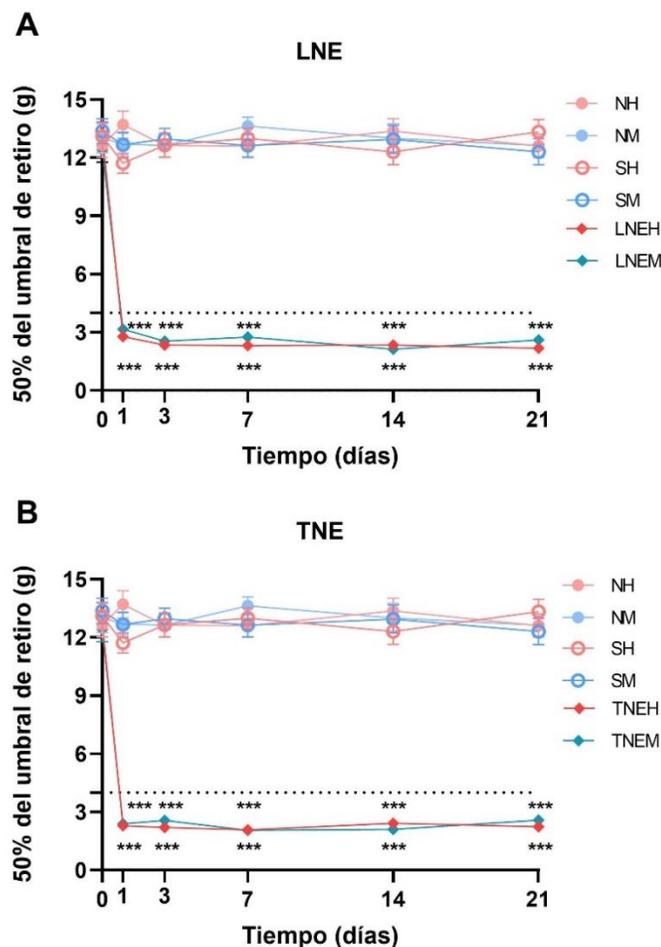
Figura 16. Diseño experimental de la participación del receptor de estrógenos alfa en la regulación de bestrofina-1 en ratas macho con TNE.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. La ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 inducen alodinia táctil en ratas

La ligadura y transección de nervios espinales redujeron el umbral de retiro frente a estímulos mecánicos por debajo de 4 g (alodinia) a partir del primer día posterior a la lesión y se mantuvo hasta por 21 días. El efecto de la lesión en los nervios espinales sobre el umbral de retiro fue similar entre ratas hembra y macho (**Figura 17A, B**).

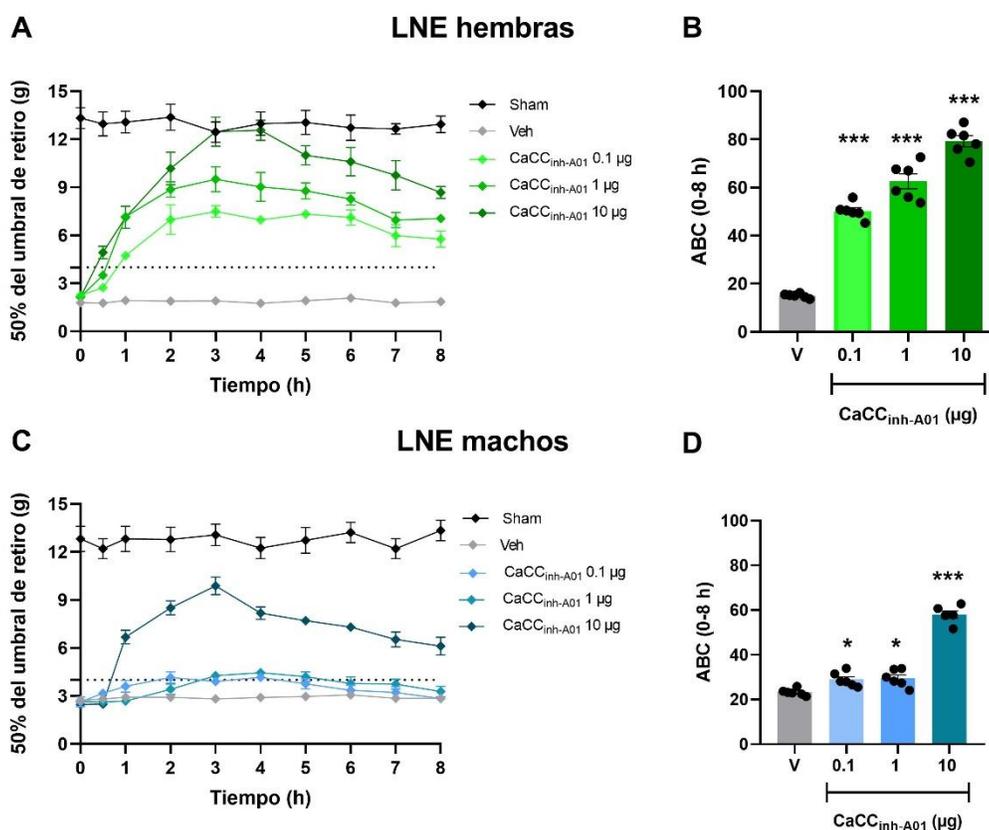


**Figura 17. Efecto de la LNE y TNE sobre el umbral de retiro mecánico en ratas.** Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar del 50% del umbral de retiro de la pata (g)  $n=6$ . NH (naïve hembras), NM (naïve machos), SH (sham hembras), SM (sham machos), LNEH (hembras), LNEM (machos), TNEH (hembras), TNEM (machos). \*\*\*  $p<0.001$  contra el grupo SH y SM, respectivamente, ANOVA de dos vías seguido de la prueba Dunnett.



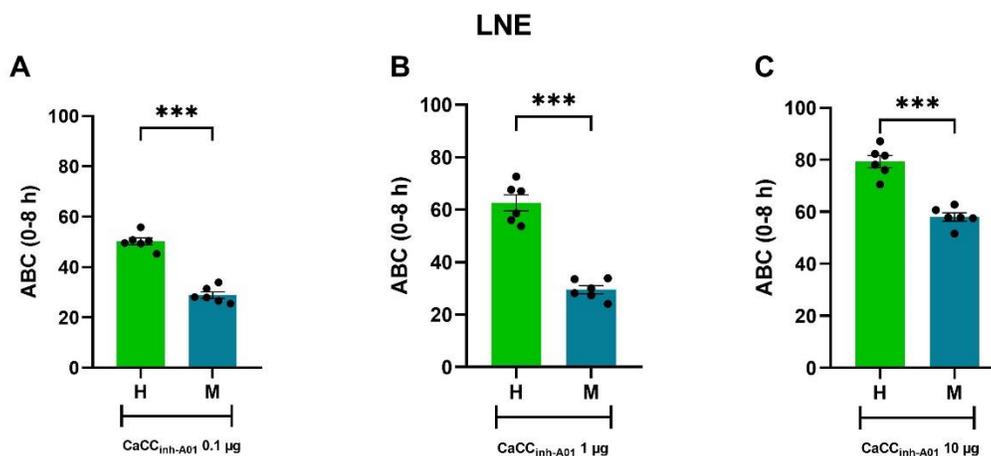
## 7.2. Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la LNE

La administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10  $\mu$ g) revirtió la alodinia táctil inducida por la LNE de manera concentración dependiente en ratas hembra (**Figura 18A, B**). En contraparte, en ratas macho sólo se observó un claro efecto antialodínico a la concentración 10  $\mu$ g (**Figura 18C, D**).



**Figura 18. Efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la LNE.** Curso temporal del efecto de la administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10  $\mu$ g) o su vehículo (Veh) sobre la alodinia táctil inducida tras la ligadura de los nervios espinales L5/L6 (LNE) en ratas hembra (A) y ratas macho (C). Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal del efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas hembra (B) y ratas macho (D). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar, n=6. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  contra el grupo Veh, ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett.

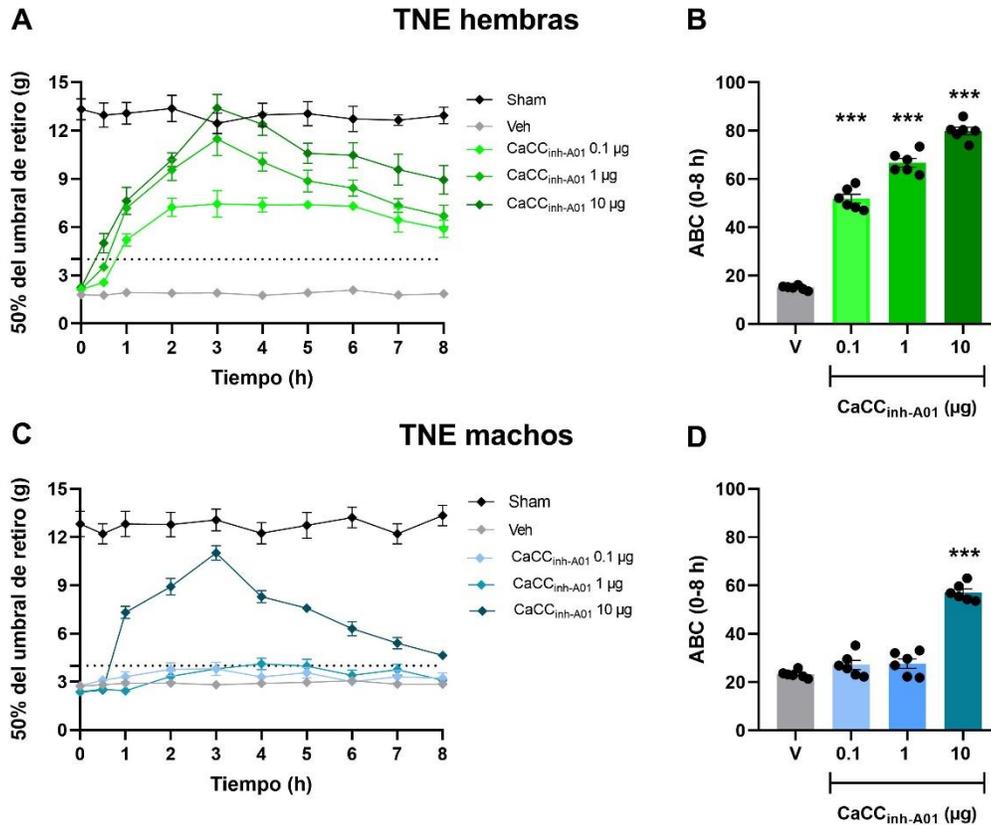
Al comparar el efecto de cada concentración entre hembras y macho se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa en el efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> entre ratas hembra y macho en todas las concentraciones empleadas (**Figura 19**).



**Figura 19. Comparación del efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> en hembras y machos con LNE.** Comparación del ABC del efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> 0.1 μg (A) CaCC<sub>inh-A01</sub> 1 μg (B) y CaCC<sub>inh-A01</sub> 10 μg (C), calculada a partir de los cursos temporales de Figura 18A (hembras) y Figura 18C (machos). H (hembras) y M (machos). \*\*\* p<0.001 contra el grupo H, Prueba *t de Student*.

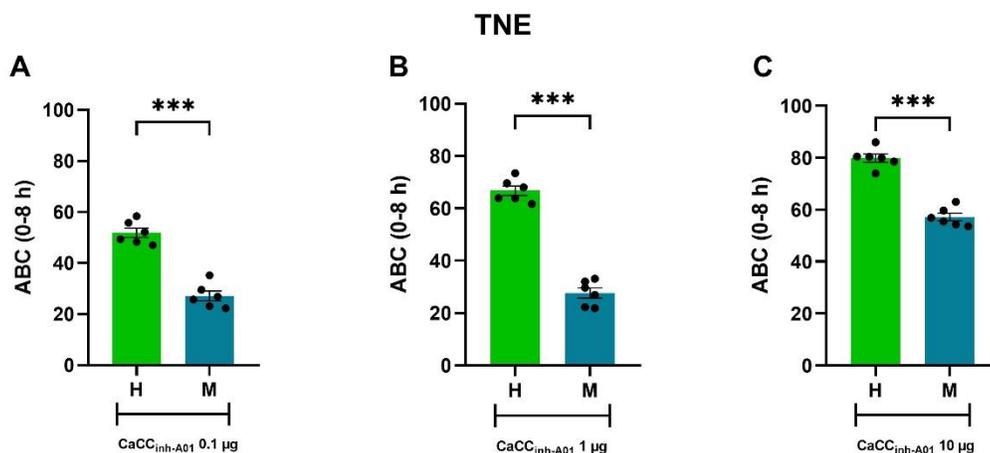
### 7.3. Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la TNE

De forma similar a los datos anteriormente mostrados, el bloqueo de los CaCC mediante el uso de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10 μg) revirtió la alodinia táctil inducida tras la TNE de manera concentración dependiente en ratas hembra (**Figura 20A, B**). No obstante, en ratas macho sólo se observó efecto a la concentración 10 μg (**Figura 20C, D**).



**Figura 20. Efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la TNE.** Curso temporal del efecto de la administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10 µg) o su vehículo (Veh) sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas hembra (A) o ratas macho (C). Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal del efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas hembra (B) y ratas macho (D). Los datos representan el promedio ± error estándar, n=6. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 contra el grupo Veh, ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett.

De igual forma, al comparar el efecto de cada concentración entre hembras y macho se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en todas las concentraciones empleadas (**Figura 21**).

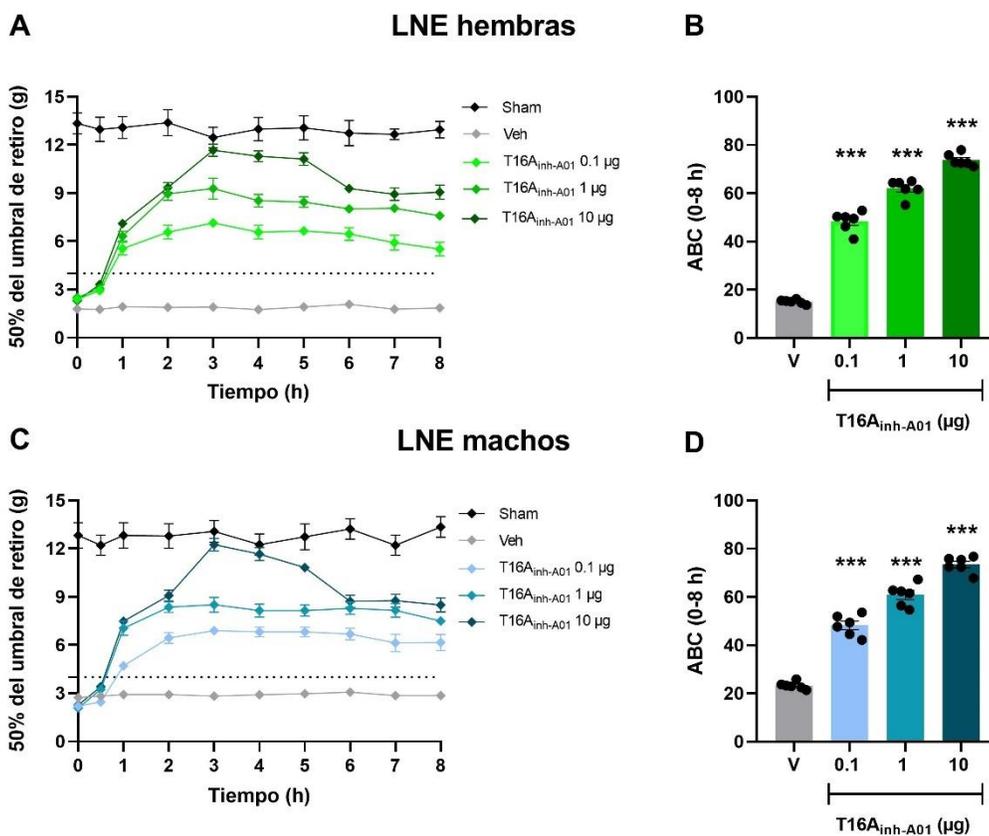


**Figura 21. Comparación del efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> en hembras y machos con TNE.** Comparación del ABC del efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> 0.1 µg (A) CaCC<sub>inh-A01</sub> 1 µg (B) y CaCC<sub>inh-A01</sub> 10 µg (C), calculada a partir de los cursos temporales de Figura 20A (hembras) y Figura 20C (machos). H (hembras) y M (machos). \*\*\*  $p < 0.001$  contra el grupo H, Prueba *t* de Student.

Los datos obtenidos sugieren que los canales CaCC participan en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por la LNE o la TNE. Además, que el efecto del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> es significativamente mayor en ratas hembra comparado con ratas macho.

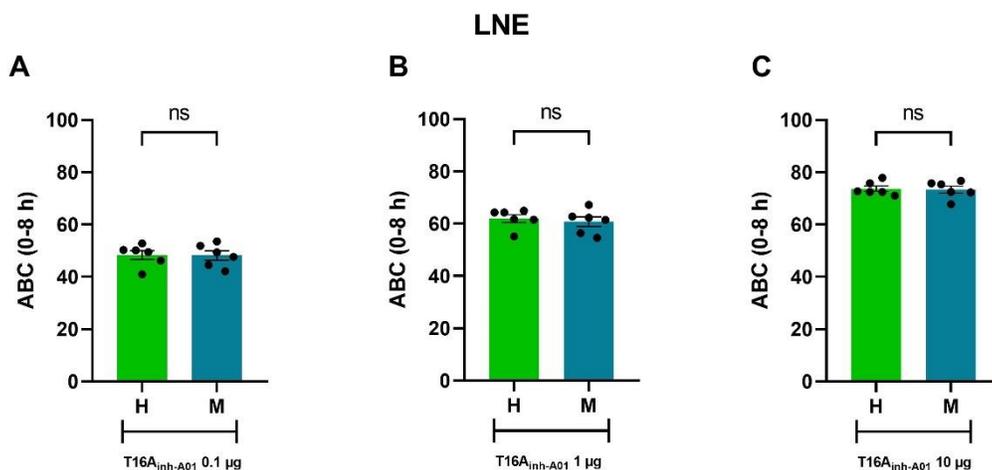
#### 7.4. Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la LNE

Con la finalidad de determinar si el canal anoctamina-1 se regula diferencialmente en ratas hembra y macho tras la lesión a los nervios espinales, ratas con LNE se administraron con T16A<sub>inh-A01</sub>, bloqueador selectivo de este canal. La administración de T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10 µg) revirtió la alodinia táctil inducida por la LNE de manera concentración dependiente, de forma similar entre ratas hembra y macho (**Figura 22**).



**Figura 22. Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la LNE.** Curso temporal del efecto de la administración i.t. de T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10 μg) o su vehículo (Veh) sobre la alodinia táctil inducida tras la ligadura de los nervios espinales L5/L6 (LNE) en ratas hembra (A) o ratas macho (C). Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal del efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> en ratas hembra (B) y ratas macho (D). Los datos representan el promedio ± error estándar, n=6. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 contra el grupo Veh, ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett.

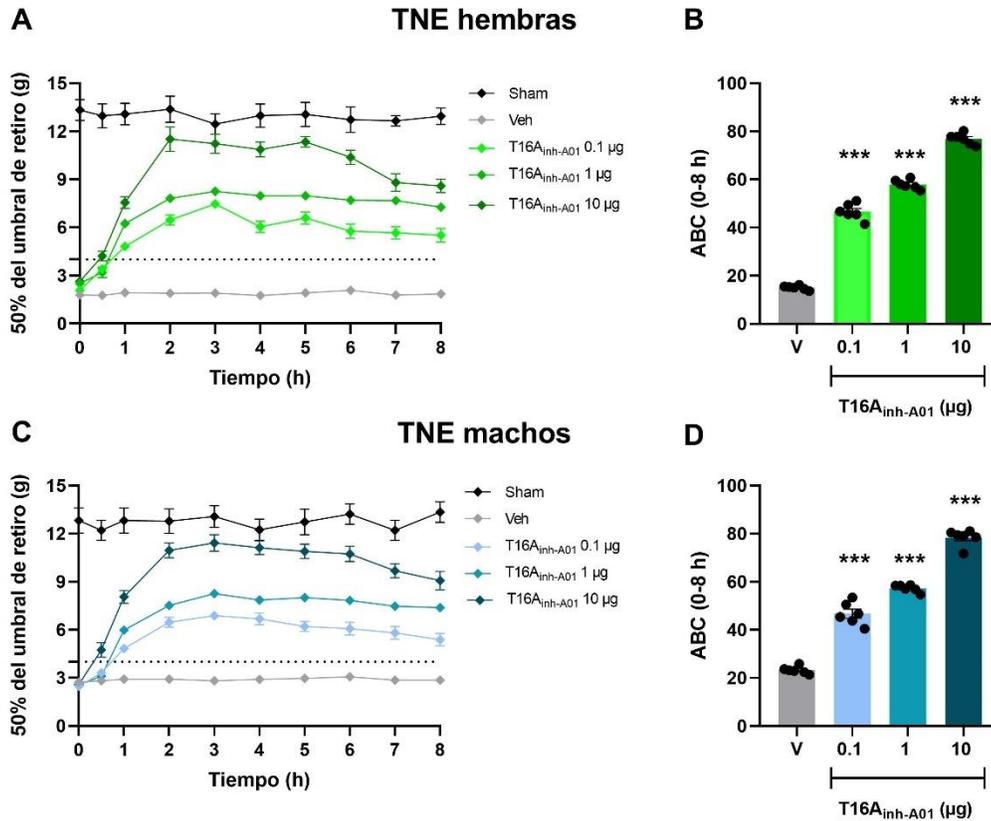
Además, al comparar el efecto de cada concentración entre hembras y macho no se observaron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones utilizadas de este fármaco (**Figura 23**).



**Figura 23. Comparación del efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> en hembras y machos con LNE.** Comparación del ABC del efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> 0.1 μg (A) T16A<sub>inh-A01</sub> 1 μg (B) y T16A<sub>inh-A01</sub> 10 μg (C), calculada a partir de los cursos temporales de Figura 22A (hembras) y Figura 22C (machos). H (hembras) y M (machos). ns: no significativo, prueba *t de Student*.

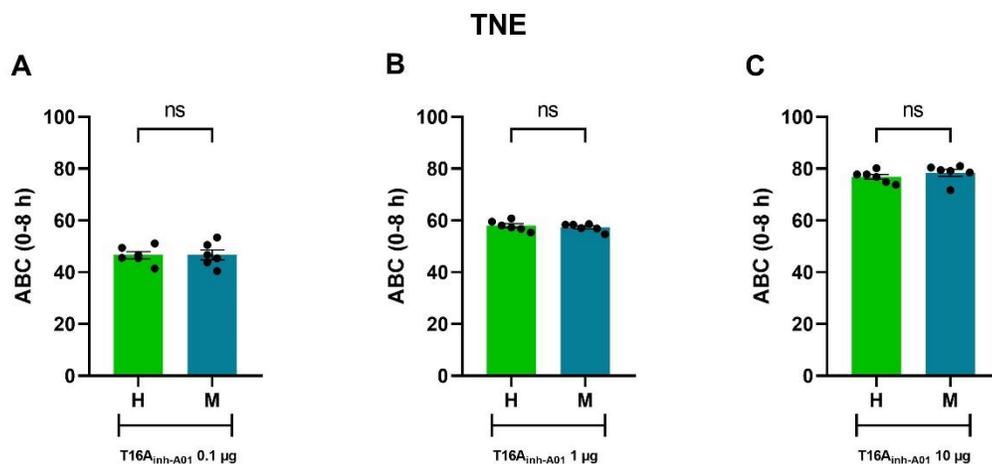
### 7.5. Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la TNE

De forma similar a los datos mostrados anteriormente, el bloqueo de anoctamina-1 con T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10 μg) revirtió la alodinia táctil inducida por la TNE de manera concentración dependiente, de forma similar entre ratas hembra y macho (**Figura 24**).



**Figura 24. Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> en la alodinia táctil inducida por la TNE.** Curso temporal del efecto de la administración i.t. de T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1, 1 y 10 μg) o su vehículo (Veh) sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas hembra (A) o ratas macho (C). Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal del efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> en ratas hembra (B) y ratas macho (D). Los datos representan el promedio ± error estándar, n=6. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 contra el grupo Veh, ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett.

Además, al comparar el efecto de cada concentración entre hembras y macho, no se observó ninguna diferencia entre los grupos (**Figura 25**).



**Figura 25. Comparación del efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> en hembras y machos con TNE.** Comparación del ABC del efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> 0.1 μg (A) T16A<sub>inh-A01</sub> 1 μg (B) y T16A<sub>inh-A01</sub> 10 μg (C), calculada a partir de los cursos temporales de Figura 24A (hembras) y Figura 24C (machos). H (hembras) y M (machos). ns: no significativo, prueba *t* de Student.

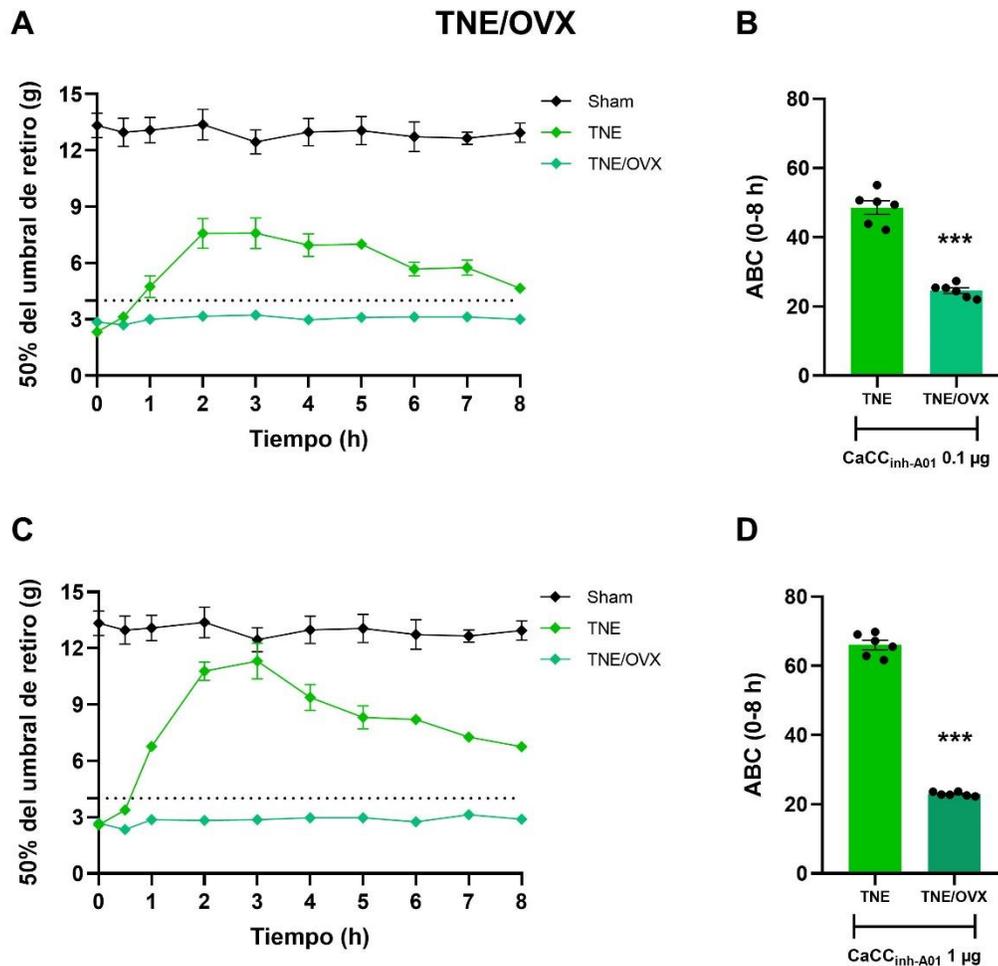
### 7.6. Efecto de la ovariectomía sobre el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas hembra con TNE

Con los datos obtenidos hasta el momento y dado que el T16A<sub>inh-A01</sub> tiene un efecto antialodínico similar entre ratas hembra y macho y no así el fármaco CaCC<sub>inh-A01</sub>, es posible que el efecto diferencial entre ratas hembra y macho observado a bajas concentraciones del CaCC<sub>inh-A01</sub> se deba a su acción sobre el canal bestrofina-1. Por lo tanto, a partir de este momento se estudió la regulación de bestrofina-1 por la presencia de hormonas gonadales en ratas hembra sujetas a dolor neuropático inducido por la transección del nervio espinal L5 (TNE), y se evaluó el efecto de 0.1 μg y 1 μg del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub>, es decir, concentraciones que fueron efectivas en ratas hembra pero no en macho.

Para determinar si el efecto antialodínico del CaCC<sub>inh-A01</sub> observado en ratas hembra se debe a la presencia de hormonas gonadales, ratas hembra se OVX 14 días previos a la TNE. La administración de 0.1 μg y 1 μg de CaCC<sub>inh-A01</sub> en



ratas con TNE/OVX no tuvo el efecto antialodínico observado en ratas con TNE, pero sin OVX (**Figura 26**).

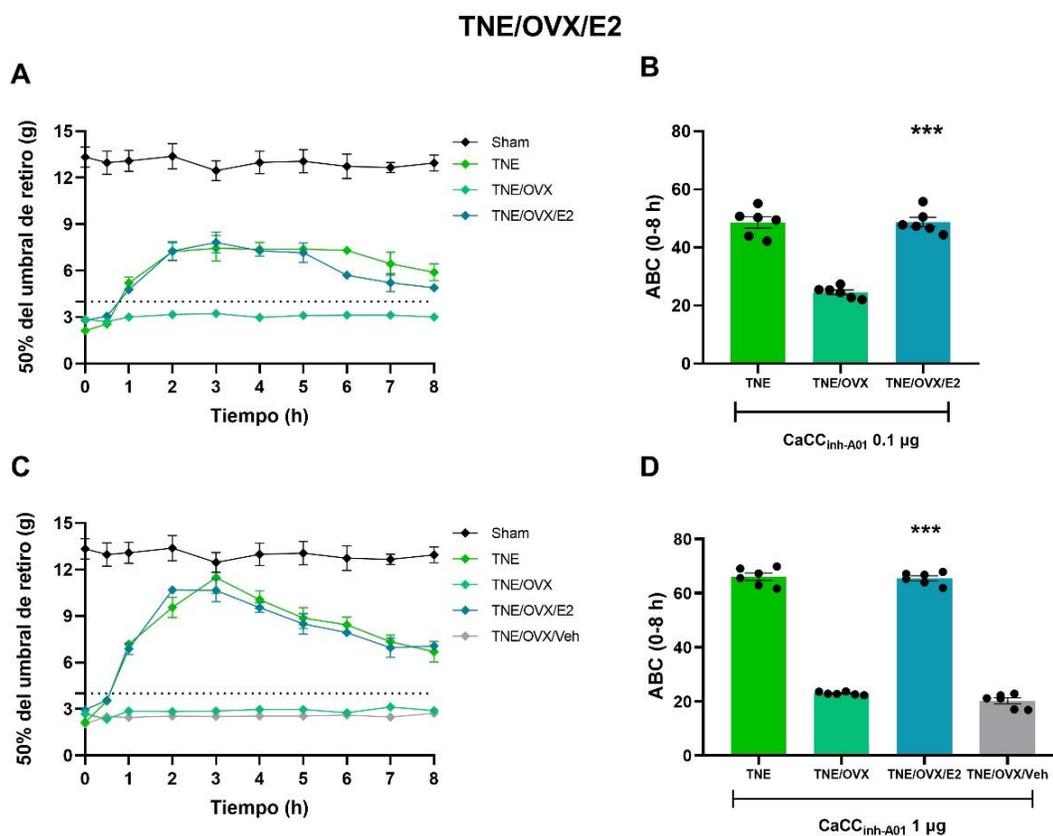


**Figura 26. Efecto de la ovariectomía sobre el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas hembra con TNE.** Curso temporal del efecto de la administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> 0.1 µg (A) y 1 µg (C) sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas hembra sin ovariectomía (TNE) y con ovariectomía (TNE/OVX). Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal del efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> 0.1 µg (B) y 1 µg (D). Los datos representan el promedio ± error estándar, n=6. \*\*\* p<0.001 contra el grupo TNE, prueba *t* de Student.

Para determinar si el 17β-estradiol regula el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas neuropáticas con TNE, se realizó una reposición de 17β-estradiol a ratas hembra con TNE/OVX. De tal forma que se encontró que la administración subcutánea de 20 µg/kg de 17β-estradiol durante 13 días



restablece el efecto antialodínico de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  a las concentraciones de 0.1  $\mu\text{g}$  y 1  $\mu\text{g}$  en ratas hembra con TNE/OVX (**Figura 27**).



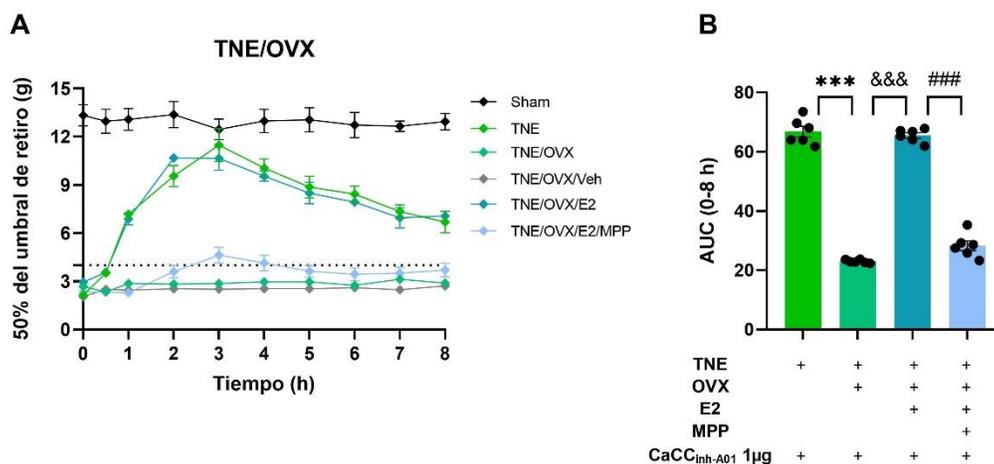
**Figura 27. Regulación del efecto antialodínico de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  por  $17\beta$ -estradiol en ratas hembra con TNE.** A) Curso temporal del efecto de la administración i.t. de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  0.1  $\mu\text{g}$  (A) y 1  $\mu\text{g}$  (C) sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas hembra en ratas hembra con ovariectomía (TNE/OVX) y con reposición de  $17\beta$ -estradiol (TNE/OVX/E2) o su vehículo (TNE/OVX/Veh). Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal del efecto del  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  0.1  $\mu\text{g}$  (B) y 1  $\mu\text{g}$  (D). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar,  $n=6$ . \*\*\*  $p<0.001$  contra el grupo TNE/OVX, prueba *t de Student*.

Los datos obtenidos sugieren que bestrofina-1 participa en el mantenimiento de la alodinia táctil inducida por TNE en ratas hembra pero no en macho y que este efecto depende de la presencia de  $17\beta$ -estradiol.



## 7.7. Efecto del antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh</sub>-A01 en ratas hembra con TNE

Para determinar si el 17 $\beta$ -estradiol regula el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh</sub>-A01 en ratas neuropáticas con TNE a través de la activación de los receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ), se realizó el antagonismo de estos receptores a ratas con TNE/OVX y reposición de 17 $\beta$ -estradiol. La administración intratecal de 0.5  $\mu$ g de MPP, un antagonista selectivo de ER $\alpha$ , evitó el efecto antialodínico de 1  $\mu$ g de CaCC<sub>inh</sub>-A01 en ratas neuropáticas con ovariectomía y con tratamiento de 17 $\beta$ -estradiol (**Figura 28**).

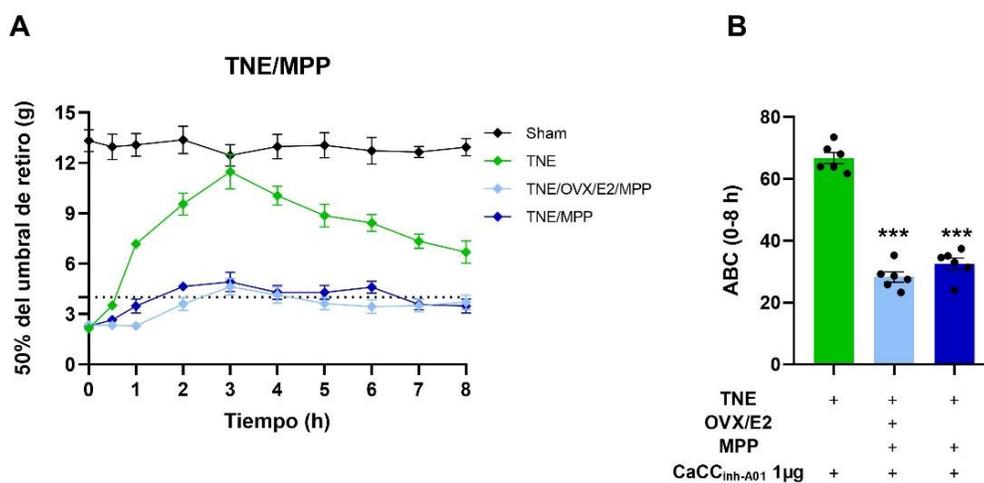


**Figura 28. Efecto del antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh</sub>-A01 en ratas hembra con TNE/OVX.** A) Curso temporal del efecto de la administración i.t. de CaCC<sub>inh</sub>-A01 1  $\mu$ g sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas hembra con TNE (TNE), con ovariectomía (TNE/OVX), con reposición de 17 $\beta$ -estradiol (TNE/OVX/E2) y con antagonismo de los ER $\alpha$  (TNE/OVX/E2/MPP). B) Área bajo la curva (ABC) calculada a partir del curso temporal. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar, n=6. \*\*\* p<0.001 vs TNE; &&& p<0.001 vs TNE/OVX; ### p<0.001 vs TNE/OVX/E2, ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey.

Los datos mencionados sugieren que el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh</sub>-A01 depende de la activación del ER $\alpha$ . Por lo tanto, con la idea de indagar si el antagonismo de los receptores a ER $\alpha$  es suficiente para evitar la acción del bloqueador CaCC<sub>inh</sub>-A01, ratas neuropáticas con TNE y sin ovariectomía se administraron intratecalmente con 0.5  $\mu$ g de MPP previo a la administración de 1  $\mu$ g de CaCC<sub>inh</sub>-A01, en estas condiciones se observó que el MPP previene



el efecto antialodínico  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  (**Figura 29**). Este resultado sugiere que el canal bestrofina-1 se regula por la activación los  $\text{ER}\alpha$  en ratas neuropáticas.



**Figura 29. Efecto del antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  en ratas hembra con TNE.** A) Curso temporal del efecto de la administración i.t. de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  1  $\mu\text{g}$  sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas hembra con TNE (TNE), con ovariectomía, reposición de  $17\beta$ -estradiol y bloqueo de los  $\text{ER}\alpha$  (TNE/OVX/E2/MPP) y TNE y antagonismo de los  $\text{ER}\alpha$  (TNE/MPP). B) ABC calculada a partir del curso temporal. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar,  $n=6$ . \*\*\*  $p < 0.001$  contra el grupo TNE, ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett.

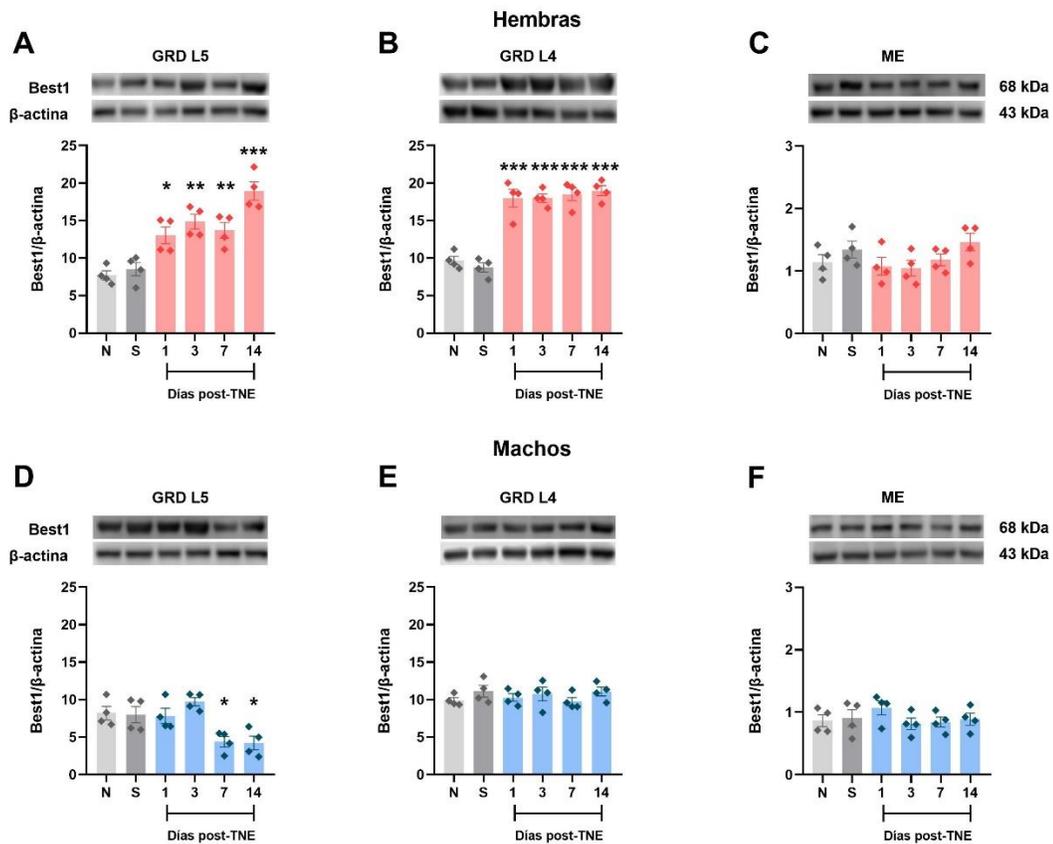
### 7.8. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de bestrofina-1

Con el objetivo de determinar si el efecto antialodínico diferencial observado con  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  en ratas neuropáticas hembra y macho está relacionado con la expresión de bestrofina-1 y anoctamina-1, se evaluó la expresión de estas proteínas en ratas sujetas a la TNE en el nervio L5 lesionado, en el nervio L4 intacto y, en la médula espinal dorsal a la altura de L4-L5, a los 1, 3, 7 y 14 días posteriores a la TNE mediante western blot.

La TNE aumentó la expresión de bestrofina-1 tanto en el nervio lesionado (L5) como en el nervio intacto (L4) en ratas hembra a los días 1, 3, 7 y 14 post-lesión (**Figura 30A, B**), mientras que en la médula espinal dorsal no se modificó la expresión de esta proteína (**Figura 30C**). Por otra parte, en ratas



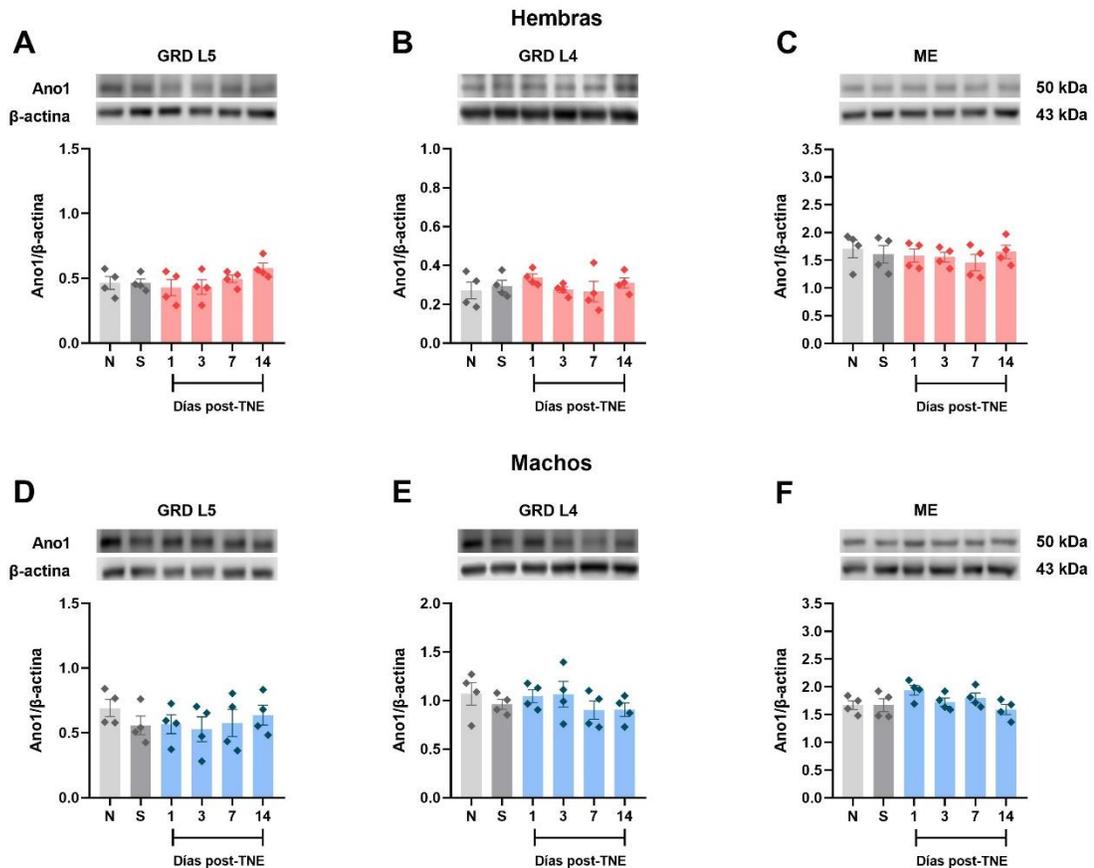
macho la TNE redujo la expresión de bestrofina-1 en el nervio L5 a los 7 y 14 días posteriores a la lesión (**Figura 30D**), pero no modificó la expresión de bestrofina-1 en L4, ni en la médula espinal dorsal de ratas macho en ninguno de los días evaluados (**Figura 30E-F**).



**Figura 30. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de bestrofina-1 en ratas hembra y macho.** Curso temporal de la expresión de bestrofina-1 en los GRD (L5 y L4) y médula espinal dorsal (ME) de ratas hembra (A-C) y macho (D-F) con transección del nervio espinal L5 (TNE) a los 1, 3, 7 y 14 post-lesión, N (naïve), S (sham). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar con respecto a la  $\beta$ -actina,  $n=4$ . \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  contra el grupo S, ANOVA de una vía seguido de la prueba Dunnett.

### 7.9. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de anoctamina-1

Por otra parte, la TNE no modificó la expresión proteica de anoctamina-1 en los nervios L5 y L4 o en la médula espinal dorsal de ratas hembra (**Figura 31A-C**) y ratas macho (**Figura 31D-F**).



**Figura 31. Efecto de la TNE sobre la expresión proteica de anoctamina-1 en ratas hembra y macho.** Curso temporal de la expresión de anoctamina-1 en los GRD (L5 y L4) y médula espinal dorsal (ME) de ratas hembra (A-C) y macho (D-F) con transección del nervio espinal L5 (TNE) a los 1, 3, 7 y 14 post-lesión, N (naïve), S (sham). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar con respecto a la  $\beta$ -actina,  $n=4$ .

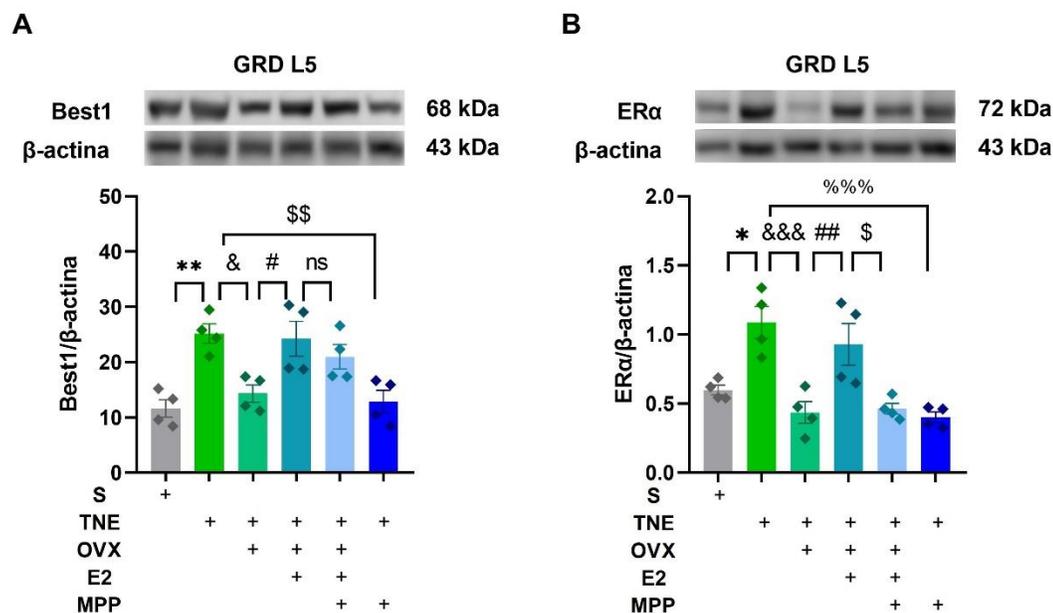
En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que el efecto antialodínico diferencial de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  observado en ratas hembra y macho neuropáticas se debe a la acción sobre el canal bestrofina-1 y no sobre anoctamina-1.

### 7.10. Efecto de la ovariectomía, reposición de $17\beta$ -estradiol y antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa

Con la finalidad de determinar si la expresión proteica de bestrofina-1 en ratas hembra puede ser regulada por  $17\beta$ -estradiol y su interacción con los  $\text{ER}\alpha$ , se



procedió a evaluar los niveles de esta proteína en ratas hembra neuropáticas ovariectomizadas, con reposición con  $17\beta$ -estradiol y antagonismo de los ER $\alpha$ . Como se mostró previamente, la TNE incrementó la expresión proteica de bestrofina-1 al día 14 post-lesión en el nervio lesionado (L5), con respecto al grupo sham. La ovariectomía, previno este incremento en ratas neuropáticas, mientras que la reposición con  $17\beta$ -estradiol restableció el efecto de la TNE de aumentar la expresión de bestrofina-1, a su vez el antagonismo de los ER $\alpha$  en ratas sin previa manipulación hormonal evitó el incremento en la expresión (**Figura 32A**). Al evaluar la expresión proteica de los ER $\alpha$  se observaron datos similares, la TNE incrementó los niveles de esta proteína con respecto al grupo sham, mientras que la ovariectomía previno este aumento. La reposición con  $17\beta$ -estradiol permitió nuevamente el efecto de la TNE y, finalmente el antagonismo de los ER $\alpha$  en ratas hembra neuropáticas con y sin previa manipulación hormonal evitó el aumento en la expresión de esta proteína (**Figura 32B**). Estos resultados sugieren que la TNE aumenta la expresión tanto de bestrofina-1 como del ER $\alpha$  en ratas hembra. Además, el hecho de que la ovariectomía impida el aumento en la expresión de estas proteínas y más aún, que la restitución con  $17\beta$ -estradiol permita una vez más el aumento en su expresión, sugiere que existe una posible regulación en la expresión de bestrofina-1 y también de ER $\alpha$  dada por  $17\beta$ -estradiol, por lo cual, estos datos indican que bestrofina-1 se regula por la activación del ER $\alpha$  en ratas hembra neuropáticas.



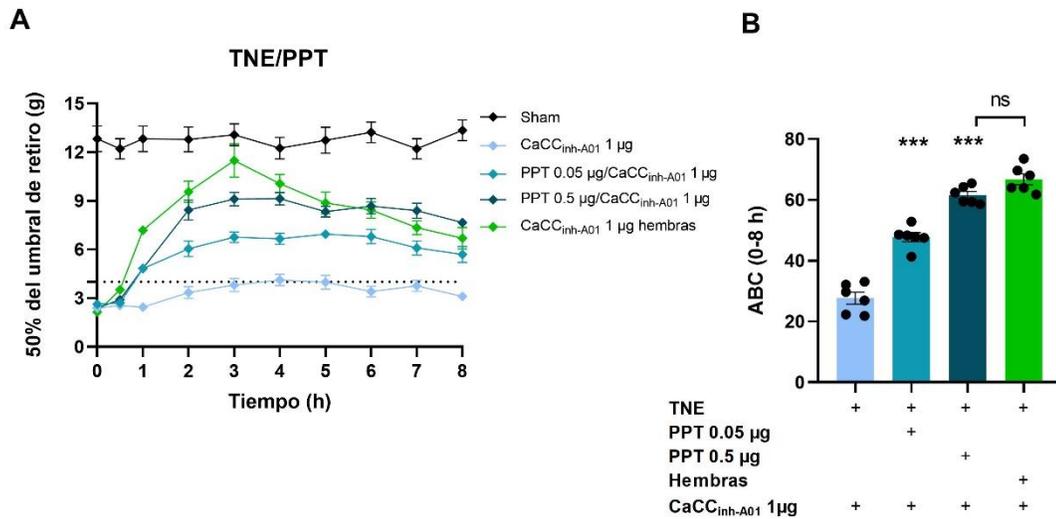
**Figura 32. Efecto de la ovariectomía, reposición de 17β-estradiol y antagonismo de los receptores de estrógenos alfa sobre la expresión proteica de bestrofina-1 y el receptor de estrógenos alfa.** Expresión proteica de bestrofina-1 (A) y ERα (B) en los GRD L5 de ratas hembra con transección del nervio espinal L5 (TNE) ovariectomizadas (OVX), con reposición de 17β-estradiol (OVX+E2) y antagonismo de los ERα (OVX+E2+MPP) 14 días post-lesión. S (sham). Los datos representan el promedio ± error estándar con respecto a la β-actina, n=4, \* S vs TNE; & TNE vs OVX; # OVX vs OVX+E2; \$ OVX+E2 vs OVX+E2+MPP; % TNE vs MPP, ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey.

### 7.11. Efecto de la activación de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas macho con TNE

Finalmente, con el objetivo de determinar si la activación de los ERα favorece la presencia de efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 μg) en ratas macho con TNE, en las que previamente se observó la ausencia de este efecto, se administró el agonista selectivo de estos receptores, PPT (0.05 y 0.5 μg). La activación de los ERα con PPT permitió el establecimiento del efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 μg), de manera concentración dependiente (0.05 y 0.5 μg). Además, la activación de los ERα con 0.5 μg de PPT, permitió un efecto antialodínico muy similar al previamente en ratas hembra con TNE, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto a este grupo



**(Figura 33).** Estos resultados sugieren que la activación de los ER $\alpha$  permite la regulación de bestrofina-1 en ratas macho neuropáticas.



**Figura 33. Efecto de la activación de los receptores de estrógenos alfa sobre el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas macho con TNE.** A) Curso temporal del efecto de la administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> 1 µg sobre la alodinia táctil inducida tras la transección del nervio espinal L5 (TNE) en ratas macho con PPT (0.05 µg y 0.5 µg) y en ratas hembra. B) ABC calculada a partir del curso temporal. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar, n=6. \*\*\* p<0.001 contra el grupo TNE, ns: no significativo, ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey.



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Los canales de cloruro activados por calcio bestrofina-1 y anoctamina-1 tienen un papel pronociceptivo y participan en el mantenimiento del dolor neuropático

En este trabajo se observó que la administración intratecal de CaCC<sub>inh-A01</sub>, bloqueador de canales CaCC (Liu et al., 2021; Tian et al., 2018), y T16A<sub>inhA01</sub>, un bloqueador selectivo del canal anoctamina-1 (Choi et al., 2018; Liu et al., 2021), revirtió la alodinia táctil inducida por los modelos de ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 en ratas hembra y macho.

Estos datos concuerdan con trabajos previos donde se reportó que el bloqueo de los CaCC, con los fármacos CaCC<sub>inh-A01</sub> y T16A<sub>inhA01</sub> en el modelo de ligadura de nervios espinales L5/L6 revierte la alodinia táctil en ratas hembra (Pineda-Farias et al., 2015). Asimismo, García y cols. describieron que la administración de CaCC<sub>inh-A01</sub> revierte la alodinia táctil inducida por la transección del nervio espinal L5 en ratas hembra (García et al., 2023). Respecto a los datos obtenidos en animales macho, Chen y cols. reportaron que el bloqueo selectivo de anoctamina-1 con T16A<sub>inh-A01</sub> en ratas con lesión del nervio preservado revierte la hipersensibilidad mecánica y al frío (Chen et al., 2021). Previamente se describió el papel pronociceptivo de los canales CaCC. En particular, se describió que la eliminación de anoctamina-1 en neuronas del GRD reduce la hipersensibilidad térmica y mecánica en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Lee et al., 2014). De manera similar, la ablación de este canal mediante el uso de ARN de interferencia incrementó la latencia de retiro ante estímulos térmicos (Cho et al., 2012).

La participación de bestrofina-1 y anoctamina-1 en la nocicepción está dada en parte por su distribución en estructuras relevantes para el procesamiento nociceptivo. Por ejemplo, se sabe que anoctamina-1 se expresa en neuronas sensoriales de diámetro pequeño y que además colocaliza con TRPV1 (Cho et al., 2012; Yang et al., 2008). Además, se ha demostrado que este canal



incrementa su expresión posterior a la lesión nerviosa o inflamatoria en el GRD y médula espinal dorsal (García et al., 2014, 2018; Pineda-Farias et al., 2015). Por su parte, bestrofina-1 también se expresa en neuronas sensoriales del GRD (André et al., 2003; Boudes et al., 2009), tanto en neuronas de diámetro mediano y grande (Al-Jumaily et al., 2007), como en neuronas de diámetro pequeño que son CGRP positivas (García et al., 2023). Además, bestrofina-1 incrementa su expresión en el GRD y médula espinal dorsal posterior a la lesión nerviosa (André et al., 2003; Boudes et al., 2009; García et al., 2023; Pineda-Farias et al., 2015).

En el dolor neuropático inducido por lesión nerviosa, se produce la liberación de múltiples mediadores inflamatorios por los nociceptores y células no neuronales (Campbell y Meyer, 2006; Costigan et al., 2009; Meacham et al., 2017). Estos mediadores interactúan con receptores acoplados a proteínas G ubicados en la membrana de los nociceptores y neuronas de proyección de la médula espinal (Ji et al., 2014; Latremoliere y Woolf, 2009; Verma et al., 2015). La interacción con estos receptores activa vías de señalización que favorecen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, mediante la vía  $\text{IP}_3$ -PLC (Ferrera et al., 2011; Gangadharan y Kuner, 2013; Mizuno y Itoh, 2009). Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  activa a los CaCC localizados en el GRD y la médula espinal dorsal, debido a la inversión en el gradiente de  $\text{Cl}^-$  asociado al dolor neuropático (Boudes y Scamps, 2012; Ferrera et al., 2011; Li et al., 2016; Mao et al., 2012; Price et al., 2010). La activación de estos canales en el GRD y médula espinal dorsal contribuye a la hiperexcitabilidad neuronal observada en el mantenimiento de este tipo de dolor (Bai et al., 2021; Hartzell et al., 2005; Vocke et al., 2013; Yang et al., 2008). Dentro de los mediadores inflamatorios que activan a estos canales, Liu y cols. reportaron que la administración de bradicinina aumenta los comportamientos nocifensivos a través de la activación de CaCC (Liu et al., 2010). Asimismo, Lee y cols. reportaron que la aplicación de una sopa inflamatoria que contenía bradicinina, PGE2, histamina y serotonina a neuronas del GRD incrementó la excitabilidad, mientras que la ablación de anoctamina-1 evitó este aumento (Lee et al., 2014).



## 8.2. Bestrofina-1 participa en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas hembra pero no en machos

Nuestros resultados muestran que el bloqueo selectivo de anoctamina-1 con T16A<sub>inh-A01</sub> produjo efecto antialodínico concentración dependiente de manera similar en ratas hembra y macho neuropáticos. Esto sugiere que este canal participa en el mantenimiento del dolor neuropático tanto en ratas hembra como en machos. Por otra parte, el bloqueo de anoctamina-1 y bestrofina-1 con la administración de CaCC<sub>inh-A01</sub> produjo efecto antialodínico concentración dependiente (0.1, 1 y 10 µg) en ratas hembra pero no en machos. Nuestros resultados muestran que las concentraciones bajas (0.1 y 1 µg) no modifican el umbral de retiro mecánico, y solo se observó un efecto antialodínico a la concentración de 10 µg. Al no observar diferencias entre machos y hembras en respuesta al bloqueo con T16A<sub>inh-A01</sub>, es probable que las diferencias en el efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> se deban a la participación de bestrofina-1 y no de anoctamina-1. Esto sugiere que bestrofina-1 participa en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas hembra pero no en machos.

Respecto a estos datos, no existe evidencia que haya descrito resultados similares en estos canales; sin embargo, existen reportes en otros receptores que regulan conductancias a Cl<sup>-</sup> en el dolor neuropático. Franco-Enzástiga y cols. reportaron que la administración de L-655,708, agonista inverso de los receptores extrasinápticos GABA<sub>A-α5</sub> revierte la alodinia táctil inducida por la ligadura de nervios espinales L5/L6 en animales hembra pero no en machos (Franco-Enzástiga et al., 2021). De forma similar, la administración de PZ-II-029, modulador alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A-α6</sub>, solo produjo efecto antialodínico en ratas hembra bajo este modelo, pero no en machos (Morales-Moreno, 2022). Esto sugiere que conductancias a Cl<sup>-</sup> mediadas por distintos canales y receptores en el dolor neuropático participan diferencialmente en animales hembra y macho.

El sexo es una variable implicada en el desarrollo y mantenimiento del dolor patológico (Fillingim, 2017; Fillingim et al., 2009; Greenspan et al., 2010). Estas



diferencias sexuales pueden ser resultado de diversos factores anatómicos y biológicos, particularmente, se ha descrito que la presencia de hormonas gonadales representa un variable importante relacionada con el dolor (Dedek et al., 2022; Fillingim, 2017; Galanopoulou y Moshé, 2003).

### **8.3. La participación de bestrofina-1 en el dolor neuropático depende de 17 $\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa**

Mostramos que el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1  $\mu$ g) en ratas hembra con transección del nervio espinal L5 depende de la presencia de 17 $\beta$ -estradiol y su interacción con los ER $\alpha$ . Esto tiene base en los siguientes resultados: (1) el efecto antialodínico de CaC<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1  $\mu$ g) se pierde por completo en ratas hembra neuropáticas ovariectomizadas; (2) la reposición de 17 $\beta$ -estradiol a ratas neuropáticas ovariectomizadas revierte el efecto de este fármaco a valores muy similares a los observados en ratas neuropáticas; (3) el antagonismo de los ER $\alpha$  en ratas neuropáticas, ovariectomizadas y con reposición de 17 $\beta$ -estradiol, elimina el efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> y (4) de manera relevante, el antagonismo de los ER $\alpha$  en ratas hembra neuropáticas sin manipulación hormonal, también elimina el efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub>.

En apoyo a estos datos, se ha descrito previamente que el efecto antialodínico de L-655,708 (agonista inverso de los receptores GABA<sub>A- $\alpha$ 5</sub>) depende de la presencia de 17 $\beta$ -estradiol y la activación de los ER $\alpha$  en ratas hembra neuropáticas (Franco-Enzástiga et al., 2021). Y el efecto farmacológico de PZ-II-029 se pierde en animales hembra neuropáticas y ovariectomizadas; mientras que la reposición con 17 $\beta$ -estradiol lo restituye, además el antagonismo de los ER $\alpha$  elimina el efecto antialodínico de este fármaco (Morales-Moreno, 2022). Lo que sugiere que la participación de algunas conductancias a Cl<sup>-</sup> en el dolor neuropático en animales hembra depende de la presencia de 17 $\beta$ -estradiol y particularmente de la activación de los ER $\alpha$ .



#### **8.4. La transección del nervio espinal L5 induce cambios dimórficos en la expresión proteica de bestrofina-1 y este efecto depende de la presencia de 17 $\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa**

Los cambios en la expresión proteica de bestrofina-1 y anoctamina-1 en GRD es dependiente de la lesión en ratas hembra. La ligadura de nervios espinales L5/L6 incrementa la expresión de anoctamina-1 en el nervio lesionado (L5) y nervio intacto (L4), y solo incrementa transitoriamente los niveles de bestrofina-1 al día siguiente de la lesión en L5 (García et al., 2018, 2023). Por otra parte, la transección del nervio espinal L5, incrementa la expresión de bestrofina-1 en el nervio lesionado (L5) y en el nervio intacto (L4) sin modificar la expresión de anoctamina-1 (García et al., 2018, 2023). Por esta razón, se decidió utilizar el modelo de transección del nervio espinal L5 para explorar la posible regulación de bestrofina-1 por el 17 $\beta$ -estradiol.

En ratas hembra, la transección del nervio espinal L5 incrementó la expresión proteica de bestrofina-1 tanto en el nervio lesionado (L5), como en el nervio intacto (L4), y no se observaron cambios en la médula espinal dorsal. Por tal razón, se determinó la expresión de este canal en ratas macho. Nuestros resultados muestran que la transección del nervio espinal L5 disminuye la expresión de bestrofina-1 en el nervio lesionado (L5) de ratas macho a los 7 y 14 días posteriores a la lesión, sin modificar la expresión en el nervio intacto (L4) o en médula espinal dorsal. Estos datos plantean la idea de que el efecto antialodínico diferencial del CaCC<sub>inh-A01</sub> observado en ratas hembra y macho neuropáticas se deban a una mayor expresión de bestrofina-1 en el GRD de las ratas neuropáticas hembra y menor expresión en ratas macho.

En concordancia con estos datos, la ligadura de nervios espinales L5/L6 aumentó el ARNm y la expresión proteica de los receptores GABA<sub>A- $\alpha$ 5</sub> en ratas hembra pero no en machos, en donde se observó una disminución importante al día 7 post-lesión (Franco-Enzástiga et al., 2021). De forma similar, este modelo indujo cambios en la expresión proteica dependientes del sexo en los



receptores GABA<sub>A-α6</sub>, debido a que los niveles de expresión de este receptor no se modificaron en ratas hembra, pero sí en machos, en donde se observó una disminución al día 3 post-lesión (Morales-Moreno, 2022).

Respecto a los resultados obtenidos con anoctamina-1, la transección del nervio espinal L5 no modificó la expresión de este canal, ni en GRD ni médula espinal dorsal de ratas hembra o macho neuropáticas, lo que sugiere que la expresión proteica de anoctamina-1 no se regula de manera diferencial de acuerdo con el sexo de los animales.

Por otra parte, los cambios en la expresión proteica de bestrofina-1 en el nervio lesionado (L5) de ratas hembra con transección del nervio espinal L5 se regulan por 17β-estradiol. En ratas hembra neuropáticas en estas condiciones la ovariectomía evitó el incremento en la expresión de bestrofina-1, mientras que la reposición de 17β-estradiol permitió nuevamente este aumento. Por otra parte, dado que el antagonismo a los ERα eliminó el efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 μg) en ratas hembra neuropáticas, decidimos evaluar si el antagonizar estos receptores modificaba la expresión de bestrofina-1. Encontramos que el antagonismo de estos receptores evita el incremento en la expresión de bestrofina-1. En contraparte, en ratas hembra con previa manipulación hormonal, no se previno el incremento en los niveles de esta proteína. También se observó que la transección del nervio espinal L5 aumentó también la expresión de ERα en el nervio lesionado (L5). De igual manera que con bestrofina-1, la ovariectomía y el antagonismo de los ERα evitó este incremento. A su vez, la reposición con 17β-estradiol permitió la regulación al alza de la expresión de ERα.

Estudios previos demostraron que el 17β-estradiol regula los cambios en la expresión proteica de los receptores GABA<sub>A-α5</sub> posterior a la lesión de los nervios espinales L5/L6 en ratas hembra; la ovariectomía en ausencia de la lesión nerviosa no modificó la expresión de estos receptores con respecto al grupo control (Franco-Enzástiga et al., 2021). La administración de esta hormona incrementa la expresión proteica del canal de cloruro dependiente de



voltaje-3 (CIC-3) sin modificar la expresión del canal (Xu et al., 2019). Kramer y Bellinger reportaron que el tratamiento con una concentración alta de  $17\beta$ -estradiol en ratas con ligadura del tendón masetero, incrementa la expresión proteica de los receptores  $GABA_{A-\alpha 6}$  en el ganglio del trigémino (Kramer y Bellinger, 2014). Además, Franco-Enzástiga y cols. reportaron que la ligadura de nervios espinales L5/L6 incrementó la expresión proteica del  $ER\alpha$  en los GRD de ratas hembra (Franco-Enzástiga et al., 2021).

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que existe una regulación de la expresión de bestrofina-1 y también de  $ER\alpha$  dada por  $17\beta$ -estradiol en ratas neuropáticas. Además, la expresión de bestrofina-1 se regula por la activación de los  $ER\alpha$  en ratas hembra con transección del nervio espinal L5.

La participación de los estrógenos, particularmente el  $17\beta$ -estradiol en la regulación de la nocicepción se puede explicar gracias a la localización de los ER en diversas áreas involucradas con este proceso (Chen et al., 2021). Por ejemplo, se sabe que los ER se expresan en diversos núcleos del SNC, y de particular interés para este estudio, en el GRD y médula espinal dorsal (Shughrue et al., 1997). La distribución de los ER canónicos en el sistema nociceptivo difiere entre ellos; en el GRD, los  $ER\alpha$  se localizan principalmente en neuronas sensoriales pequeñas y medianas, mientras que los  $ER\beta$  se expresan en diferentes neuronas sensoriales. En médula espinal dorsal, los  $ER\alpha$  se encuentran en las láminas superficiales I y II (que reciben predominantemente información nociceptiva) y los  $ER\beta$  se expresan en las láminas más profundas II a V (que reciben información nociceptiva y propioceptiva) (Papka et al., 2001; Shughrue et al., 1997).

En este estudio se observó que la transección del nervio espinal L5 incrementó la expresión de bestrofina-1 en los GRD L5 y L4 en ratas hembra, es posible que el mecanismo de regulación a través de  $17\beta$ -estradiol y la activación de los  $ER\alpha$  sea por la vía de señalización genómica directa, sin descartar un mecanismo no genómico. En esta vía, la unión del  $17\beta$ -estradiol con los  $ER\alpha$  localizados en los GRD, induce la dimerización de estos receptores



permitiendo la translocación al núcleo, donde puede unirse al ERE del gen *VMD2* que codifica para bestrofina-1 (Oviedo, 2022 comunicación personal). Por lo cual, es probable que posterior a la lesión, este mecanismo ocurra para promover la transcripción génica de bestrofina-1, que en las condiciones de este estudio se observa como un incremento en la función y expresión proteica de este canal en ratas hembra, pero no en machos.

Como en ratas macho la concentración de  $17\beta$ -estradiol circulante es 6-8 veces menor con respecto a ratas hembra (Lan et al., 2018; Russell y Grossmann, 2019), es posible que no ocurra la activación de los ER $\alpha$  y, por lo tanto, no se observa este mecanismo de regulación hormonal. Con ello en mente se decidió activar el ER $\alpha$  con el agonista selectivo de los ER $\alpha$ , el PPT (0.05 y 0.5  $\mu$ g), en ratas macho. Bajo estas condiciones, la administración de CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 $\mu$ g) provocó un efecto antialodínico muy similar al observado en las ratas hembra. Este resultado sugiere que la activación de los ER $\alpha$  permite la regulación de bestrofina-1 en ratas macho neuropáticas. No quedan descartados otros mecanismos que puedan estar involucrados en la regulación de la función y expresión de bestrofina-1 en ratas macho, como modificaciones postraduccionales o epigenéticas, sin embargo, se requieren más experimentos para comprobar estos mecanismos.



## 9. CONCLUSIONES

Bestrofina-1 tiene un papel pronociceptivo y participa en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por la ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 en ratas hembra pero no en ratas macho.

Anoctamina-1 tiene un papel pronociceptivo y participa en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por la ligadura de nervios espinales L5/L6 y transección del nervio espinal L5 en ratas hembra y macho.

La función y expresión de bestrofina-1 está regulada al alza por  $17\beta$ -estradiol y su interacción con el receptor de estrógenos alfa en ratas hembra con dolor neuropático inducido por la transección del nervio espinal L5.



## 10. PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de posibles marcadores de daño que se activen posterior a la lesión nerviosa y que puedan estar involucrados el mecanismo de regulación hormonal sobre el canal bestrofina-1.
- Evaluar mediante coimmunoprecipitación de la cromatina la unión de los ER $\alpha$  al ERE de *VMD2*.
- Evaluar si la vía de señalización estrogénica no genómica indirecta participa en la regulación de bestrofina-1 posterior a la lesión nerviosa, a través de mecanismos transduccionales que involucren la señalización del Ca<sup>2+</sup>.
- Analizar mediante inmunofluorescencia la localización celular de los ER $\alpha$  antes y después de la lesión nerviosa.
- Evaluar mediante técnicas electrofisiológicas la actividad de bestrofina-1 en ratas hembra y macho bajo los modelos de transección del nervio espinal L5 y ligadura de nervios espinales L5/L6.
- Evaluar posibles mecanismos de regulación epigenéticos o postraduccionales sobre bestrofina-1 en ratas macho.



## 11. REFERENCIAS

- Acaz-Fonseca, E., Durán, J., Carrero, P., García-Segura, L., & Arévalo, M. (2015). Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury. *GLIA*, 63(11), 1966–1981.
- Agostinelli, E., & Tammaro, P. (2022). Polymodal Control of TMEM16x Channels and Scramblases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1–30.
- Al-Hosni, R., Ilkan, Z., Agostinelli, E., & Tammaro, P. (2022). The pharmacology of the TMEM16A channel: therapeutic opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*, 43(9), 712–725.
- Al-Jumaily, M., Kozlenkov, A., Mechaly, I., Fichard, A., Matha, V., Scamps, F., Valmier, J., & Carroll, P. (2007). Expression of three distinct families of calcium-activated chloride channel genes in the mouse dorsal root ganglion. *Neuroscience Bulletin*, 23(5), 293–299.
- Altier, C., Dale, C., Kisilevsky, A., Chapman, K., Castiglioni, A., Matthews, E., Evans, R., Dickenson, A., Lipscombe, D., Vergnolle, N., & Zamponi, G. (2007). Differential Role of N-Type Calcium Channel Splice Isoforms in Pain. *The Journal of Neuroscience*, 27(24), 6363–6373.
- Amir, R., Kocsis, J., & Devor, M. (2005). Multiple Interacting Sites of Ectopic Spike Electrogenesis in Primary Sensory Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 25(10), 2576–2585.
- André, S., Boukhaddaoui, H., Campo, B., Al-Jumaily, M., Mayeux, V., Greuet, D., Valmier, J., & Scamps, F. (2003). Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neurophysiology*, 90(6), 3764–3773.
- Apkarian, A., Bushnell, M., Treede, R., & Zubieta, J. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*, 9, 463–484.



- Bai, W., Liu, M., & Xiao, Q. (2021). The diverse roles of TMEM16A  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in inflammation. *Journal of Advanced Research*, 33, 53–68.
- Basbaum, A., Bautista, D., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284.
- Biason-Lauber, A., & Lang-Muritano, M. (2022). Estrogens: Two nuclear receptors, multiple possibilities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 554.
- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), 833–842.
- Boudes, M., Sar, C., Menigoz, A., Hilaire, C., Péquignot, M., Kozlenkov, A., Marmorstein, A., Carroll, P., Valmier, J., & Scamps, F. (2009). Best1 Is a Gene Regulated by Nerve Injury and Required for  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{Cl}^-$  Current Expression in Axotomized Sensory Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(32), 10063–10071.
- Boudes, M., & Scamps, F. (2012). Calcium-activated chloride current expression in axotomized sensory neurons: what for? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(35).
- Bushnell, M., Čeko, M., & Low, L. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 502–511.
- Busserolles, J., Tsantoulas, C., Eschalier, A., & López García, J. (2016). Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *Pain*, 157, S7–S14.
- Campbell, J., & Meyer, R. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, 52(1), 77–92.
- Cavalli, E., Mammana, S., Nicoletti, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). The neuropathic pain: An overview of the current treatment



and future therapeutic approaches. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 33, 1–10.

- Chaplan, S., Bach, F., Pogrel, J., Chung, J., & Yaksh, T. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63.
- Chaplan, S., Guo, H., Lee, D., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A., Butler, M., Brown, S., & Dubin, A. (2003). Neuronal Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels Drive Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*, 23(4), 1169–1178.
- Chen, C., Broom, D., Liu, Y., de Nooij, J., Li, Z., Cen, C., Samad, O., Jessell, T., Woolf, C., & Ma, Q. (2006). Runx1 Determines Nociceptive Sensory Neuron Phenotype and Is Required for Thermal and Neuropathic Pain. *Neuron*, 49, 365–377.
- Chen, Q., Kong, L., Xu, Z., Cao, N., Tang, X., Gao, R., Zhang, J., Deng, S., Tan, C., Zhang, M., Wang, Y., Zhang, L., Ma, K., Li, L., & Si, J. (2021). The Role of TMEM16A/ERK/NK-1 Signaling in Dorsal Root Ganglia Neurons in the Development of Neuropathic Pain Induced by Spared Nerve Injury (SNI). *Molecular Neurobiology*, 58(11), 5772–5789.
- Chen, Q., Zhang, W., Sadana, N., & Chen, X. (2021). Estrogen receptors in pain modulation: cellular signaling. *Biology of Sex Differences*, 12(22).
- Chen, Y., & Abdi, S. (2022). Basic Science: Pain Mechanisms and Pathways. In *Anesthesiology In-Training Exam Review* (pp. 185–189).
- Chiu, I., Heesters, B., Ghasemlou, N., von Hehn, C., Zhao, F., Tran, J., Wainger, B., Strominger, A., Muralidharan, S., Horswill, A., Wardenburg, J., Hwang, S., Carroll, M., & Woolf, C. (2013). Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature*, 501(7465), 52–57.



- Cho, H., Yang, Y., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S., Na, H., Harfe, B., Wang, F., Raouf, R., Wood, J., & Oh, U. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nature Neuroscience*, 15(7), 1015–1022.
- Choi, S., Kang, H., Wu, M., Jiao, H., Shin, D., Hong, C., & Jun, J. (2018). Effects of Ca<sup>2+</sup>-Activated Cl<sup>-</sup> Channel ANO1 inhibitors on Pacemaker Activity in Interstitial Cells of Cajal. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2887–2899.
- Cioffi, C. (2018). Modulation of Glycine-Mediated Spinal Neurotransmission for the Treatment of Chronic Pain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(7), 2652–2679.
- Coghill, R. (2020). The Distributed Nociceptive System— A Framework For Understanding Pain. *Trends in Neurosciences*, 43(10), 780–794.
- Cornil, C., Ball, G., & Balthazart, J. (2006). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogens: Where do the estrogens come from? *Brain Research*, 1126(1), 2–26.
- Cornil, C., Ball, G., & Balthazart, J. (2015). The dual action of estrogens hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 38(7), 408–416.
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. (2009). Neuropathic Pain. *Annual Review of Neuroscience*, 1–32.
- Coull, J., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S., 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, 938–942.
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19(3), 197–209.
- Dedek, A., Xu, J., Lorenzo, L., Godin, A., Kandegedara, C., Glavina, G., Landrigan, J., Lombroso, P., De Koninck, Y., Tsai, E., &



- Hildebrand, M. (2022). Sexual dimorphism in a neuronal mechanism of spinal hyperexcitability across rodent and human models of pathological pain. *Brain*, 145(3), 1124–1138.
- Devor, M. (2006). Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *The Journal of Pain*, 7(Suppl 1), S3–S12.
  - Devor, M. (2009). Ectopic discharge in A $\beta$  afferents as a source of neuropathic pain. *Experimental Brain Research*, 196, 115–128.
  - Dib-Hajj, S., Cummins, T., Black, J., & Waxman, S. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annual Review of Neuroscience*, 33, 325–347.
  - Dickson, V., Pedi, L., & Long, S. (2014). Structure and insights into the function of a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel. *Nature*, 516(7530), 213–218.
  - Dixon, W. (1980). Efficient analysis of experimental observations. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20, 441–462.
  - Dubin, A., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772.
  - Dureja, G., Iyer, R., Das, G., Ahdal, J., & Narang, P. (2017). Evidence and consensus recommendations for the pharmacological management of pain in India. *Journal of Pain Research*, 10, 709–736.
  - Fenton, B., Shih, E., & Zolton, J. (2015). The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain. *Pain Management*, 5(4), 297–317.
  - Ferrera, L., Caputo, A., & Galletta, L. (2010). TMEM16A protein: a new identity for Ca<sup>(2+)</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> channels. *Physiology (Bethesda)*, 25(6), 357–363.
  - Ferrera, L., Caputo, A., Ubby, I., Bussani, E., Zegarra-Moran, O., Ravazzolo, R., Pagani, F., & Galletta, L. (2009). Regulation of



TMEM16A Chloride Channel Properties by Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33360–33368.

- Ferrera, L., Scudieri, P., Sondo, E., Caputo, A., Caci, E., Zegarra-Moran, O., Ravazzolo, R., & Galletta, L. (2011). A minimal isoform of the TMEM16A protein associated with chloride channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(9), 2214–2223.
- Ferrera, L., Zegarra-Moran, O., & Galletta, L. (2011). Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Comprehensive Physiology*, 1(4), 2155–2174.
- Fillingim, R. (2017). Individual differences in pain: understanding the mosaic that makes pain personal. *Pain*, 158, S11–S18.
- Fillingim, R., King, C., Ribeiro-Dasilva, M., Rahim-Williams, B., & Riley, J. (2009). Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *The Journal of Pain*, 10(5), 447–485.
- Franco-Enzástiga, U., García, G., Murbartián, J., González-Barrios, R., Salinas-Abarca, A., Sánchez-Hernández, B., Tavares-Ferreira, D., Herrera, L., Barragán-Iglesias, P., Delgado-Lezama, R., Price, T., & Granados-Soto, V. (2021). Sex-dependent pronociceptive role of spinal  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> receptor and its epigenetic regulation in neuropathic rodents. *Journal of Neurochemistry*, 156(6), 897–916.
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 116, 135–170.
- Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, K., & Noguchi, K. (2008). Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 510(2), 188–206.
- Galanopoulou, A., & Moshé, S. (2003). Role of sex hormones in the sexually dimorphic expression of KCC2 in rat substantia nigra. *Experimental Neurology*, 184(2), 1003–1009.



- Gangadharan, V., & Kuner, R. (2013). Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, 6(4), 889–895.
- García, G., Martínez-Magaña, C., Oviedo, N., Granados-Soto, V., & Murbartián, J. (2023). Bestrophin-1 Participates in Neuropathic Pain Induced by Spinal Nerve Transection but not Spinal Nerve Ligation. *The Journal of Pain*, 24(4), 689–705.
- García, G., Martínez-Rojas, V., Oviedo, N., & Murbartián, J. (2018). Blockade of anoctamin-1 in injured and uninjured nerves reduces neuropathic pain. *Brain Research*, 1696, 38–48.
- García, G., Martínez-Rojas, V., Rocha-González, H., Granados-Soto, V., & Murbartián, J. (2014). Evidence for the participation of Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels in formalin-induced acute and chronic nociception. *Brain Research*, 1579, 35–44.
- Gilron, I., Baron, R., & Jensen, T. (2015). Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 90(4), 532–545.
- Goodwin, G., & McMahon, S. (2021). The physiological function of different voltage-gated sodium channels in pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 22, 263–274.
- Greenspan, J., Craft, R., LeResche, L., Arendt-Nielsen, L., Berkley, K., Fillingim, R., Gold, M., Holdcroft, A., Lautenbacher, S., Mayer, E., Mogil, J., Murphy, A., & Traub, R. (2010). Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain*, 132, S26–S45.
- Grewal, S., Smith, J., & Carr, A. (2021). Bestrophinopathies: perspectives on clinical disease, Bestrophin-1 function and developing therapies. *Therapeutic Advances in Ophthalmology*, 13, 1–13.



- Hall, J., Couse, J., & Korach, K. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869–36872.
- Hartzell, C., Putzier, I., & Arreola, J. (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annual Review of Physiology*, 67, 719–758.
- Hawn, M., Akin, E., Greenwood, I., & Leblanc, N. (2021). Molecular mechanisms of activation and regulation of ANO1-Encoded Ca<sup>2+</sup>-Activated Cl<sup>-</sup> channels. *Channels*, 15(1), 569–603.
- 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, 39–46.
- Huang, F., Wong, X., & Jan, L. (2012). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXV: Calcium-Activated Chloride Channels. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 1–15.
- Hwang, W., Lee, T., Kim, N., & Kwon, J. (2021). The Role of Estrogen Receptors and Their Signaling across Psychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 373.
- Jarvis, M., & Boyce-Rustay, J. (2009). Neuropathic pain: models and mechanisms. *Current Pharmaceutical Design*, 15(15), 1711–1716.
- Ji, R., Kohno, T., Moore, K., & Woolf, C. (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences*, 26(12), 696–705.
- Ji, R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., & Maixner, W. (2019). Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology*, 129(2), 343–366.
- Ji, R., Xu, Z., & Gao, Y. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), 533–548.



- Johnson, A., Guziewicz, K., Lee, C., Kalathar, R., Pulido, J., Marmorstein, L., & Marmorstein, A. (2017). Bestrophin 1 and Retinal Disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 58, 45–69.
- Kamaledin, M. (2017). Molecular, biophysical, and pharmacological properties of calcium-activated chloride channels. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 787–798.
- Kaneko, H., Putzier, I., Frings, S., Kaupp, U., & Gensch, T. (2004). Chloride Accumulation in Mammalian Olfactory Sensory Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7931–7938.
- Keilani, M., Crevenna, R., & Dorner, T. (2018). Sleep quality in subjects suffering from chronic pain. *Wien Klin Wochenschr*, 130(1–2), 31–36.
- Kim, S., & Chung, J. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 355–363.
- Knowlton, A., & Lee, A. (2012). Estrogen and the Cardiovascular System. *Pharmacology & Therapeutics*, 135(1), 54–70.
- Krämer, F., Stöhr, H., & Weber, B. (2004). Cloning and characterization of the murine Vmd2 RFP-TM gene family. *Cytogenetic and Genome Research*, 105(1), 107–114.
- Kramer, P., & Bellinger, L. (2014). Infusion of Gabra6 siRNA into the trigeminal ganglia increased the myogenic orofacial nociceptive response of ovariectomized rats treated with 17 $\beta$ -estradiol. *Neuroscience*, 278, 144–153.
- Kranjc, A., Grillo, F., Rievaj, J., Boccaccio, A., Pietrucci, F., Menini, A., Carloni, P., & Anselmi, C. (2009). Regulation of Bestrophins by Ca<sup>2+</sup>: A Theoretical and Experimental Study. *Plos One*, 4(3), e4672.
- Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine*, 16, 1258–1266.
- Kunzelmann, K., Kongsuphol, P., Aldehni, F., Tian, Y., Ousingsawat, J., Warth, R., & Schreiber, R. (2009). Bestrophin and



TMEM16—Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channels with different functions. *Cell Calcium*, 46(4), 233–241.

- Kuzawińska, O., Lis, K., Cudna, A., & Bałkowiec-Iskra, E. (2014). Gender differences in the neurochemical response of trigeminal ganglion neurons to peripheral inflammation in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 74(2), 227–232.
- Lan, H., Lin, J., Chen, C., Chu, P., & Chen, C. (2018). Estradiol level of male rat is correlated with depression and anxiety after traumatic stress. *Journal of Medical Sciences*, 38(4), 176–184.
- Latremoliere, A., & Woolf, C. (2009). Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9), 895–926.
- Lee, B., Cho, H., Jung, J., Yang, Y., Yang, D., & Oh, U. (2014). Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Molecular Pain*, 10(5).
- Leknes, S., & Tracey, I. (2008). A common neurobiology for pain and pleasure. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(4), 314–320.
- Li, Y., Dorsi, M., Meyer, R., & Belzberg, A. (2000). Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain*, 85(3), 493–502.
- Liu, B., Linley, J., Du, X., Zhang, X., Ooi, L., Zhang, H., & Gamper, N. (2010). The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K<sup>+</sup> channels and activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1240–1252.
- Liu, Y., Li, Y., Fang, Z., Liao, H., Zhang, Y., Lin, J., Liu, F., & Shen, J. (2022). NMDARs mediate peripheral and central sensitization contributing to chronic orofacial pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16(999509), 1–23.
- Liu, Y., Liu, Z., & Wang, K. (2021). The Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel ANO1/TMEM16A: An emerging therapeutic target for



epithelium-originated diseases? *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(6), 1412–1433.

- Mapplebeck, J., Beggs, S., & Salter, M. (2017). Molecules in pain and sex: a developing story. *Molecular Brain*, 10(9), 1–8.
- Marmorstein, A., & Kinnick, T. (2007). Focus on Molecules: Bestrophin (Best-1). *Experimental Eye Research*, 85(4), 423–424.
- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D., & Haroutounian, S. (2017). Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Current Pain and Headache Reports*, 21(28), 1–11.
- Middleton, S., Barry, A., Comini, M., Li, Y., Ray, P., Shiers, S., Themistocleous, A., Uhelski, M., Yang, X., Dougherty, P., Price, T., & Bennett, D. (2021). Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic. *Brain*, 144(5), 1312–1335.
- Millan, M. (1999). The Induction of Pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57, 1–164.
- Miller, A., Vaisey, G., & Long, S. (2019). Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. *ELife*, 8, e43231.
- Mills, S., Nicolson, K., & Smith, B. (2019). Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Br J Anaesth*, e273–e283.
- Mizumura, K. (1997). Peripheral mechanism of hyperalgesia--sensitization of nociceptors. *Nagoya Journal of Medical Science*, 60, 69–87.
- Mizuno, N., & Itoh, H. (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals*, 17(1), 42–54.
- Mogil, J. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(12), 859–866.



- Montgomery-Orr, P., Cobb-Shank, B., & Conner-Black, A. (2017). The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(4), 407–418.
- Morales-Moreno, C. (2022). *Regulación del receptor GABAA- $\alpha$ 6 por estradiol en el dolor neuropático en la rata*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- NCBI. (2023). *BEST1 (VMD2) bestrophin 1*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=VMD2>
- Nguyen, D., & Chen, T. (2022). Structure and Function of Calcium-Activated Chloride Channels and Phospholipid Scramblases in the TMEM16 Family. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. (pp. 1–28).
- Nickel, F., Seifert, F., Lanz, S., & Maihöfner, C. (2012). Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, 22(2), 81–91.
- Oh, S., & Lee, C. (2017). Distribution and Function of the Bestrophin-1 (Best1) Channel in the Brain. *Experimental Neurobiology*, 26(3), 113–121.
- Owji, A., Kittredge, A., Zhang, Y., & Yang, T. (2021). Structure and Function of the Bestrophin family of calcium-activated chloride channels. *Channels*, 15(1), 604–623.
- Papka, R., Storey-Workley, M., Shughrue, P., Merchenthaler, I., Collins, J., Usip, S., Saunders, P., & Shupnik, M. (2001). Estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell and Tissue Research*, 304, 193–214.
- Park, C., Xu, Z., Berta, T., Han, Q., Chen, G., Liu, X., & Ji, R. (2014). Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron*, 82(1), 47–54.



- Park, H., Oh, S., Han, K., Woo, D., Park, H., Mannaioni, G., Traynelis, S., & Lee, C. (2009). Bestrophin-1 Encodes for the  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated Anion Channel in Hippocampal Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 13063–13073.
- Patapoutian, A., Tate, S., & Woolf, C. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(1), 55–68.
- Picollo, A., Malvezzi, M., & Accardi, A. (2015). TMEM16 proteins: unknown structure and confusing functions. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), 94–105.
- Pineda-Farias, J., Barragán-Iglesias, P., Loeza-Alcocer, E., Torres-López, J., Rocha-González, H., Pérez-Severiano, F., Delgado-Lezama, R., & Granados-Soto, V. (2015). Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats. *Molecular Pain*, 11(41), 1–14.
- Raja, S., Carr, D., Cohen, M., Finnerup, N., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F., Mogil, J., Ringkamp, M., Sluka, K., Song, X., Stevens, B., Sullivan, M., Tutelman, P., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982.
- Ren, J., & Wu, J. (2012). 17 $\beta$ -Estradiol Rapidly Activates Calcium Release from Intracellular Stores via the GPR30 Pathway and MAPK Phosphorylation in Osteocyte-Like MLO-Y4 Cells. *Calcified Tissue International*, 90, 411–419.
- Rocha-González, H., Mao, S., & Alvarez-Leefmans, F. (2008).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  Cotransport and Intracellular Chloride Regulation in Rat Primary Sensory Neurons: Thermodynamic and Kinetic Aspects. *Journal of Neurophysiology*, 100(1), 169–184.
- Rolke, R., Magerl, W., Campbell, K., Schalber, C., Caspari, S., Birklein, F., & Treede, R. (2006). Quantitative sensory testing: a



comprehensive protocol for clinical trials. *European Journal of Pain*, 10(1), 77–88.

- Rosen, S., Ham, B., & Mogil, J. (2017). Sex differences in neuroimmunity and pain. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1), 500–508.
- Rosenberger, D., Blechschmidt, V., Timmerman, H., Wolff, A., & Treede, R. (2020). Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *Journal of Neural Transmission*, 127(4), 589–624.
- Ruau, D., Liu, L., Clark, J., Angst, M., & Butte, A. (2012). Sex differences in reported pain across 11,000 patients captured in electronic medical records. *The Journal of Pain*, 13(3), 228–234.
- Russell, N., & Grossmann, M. (2019). Mechanisms in endocrinology: Estradiol as a male hormone. *European Journal of Endocrinology*, 181(1), R23–R43.
- Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H., & Tanabe, T. (2010). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type  $Ca^{2+}$  channel. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 20(10), 2349–2356.
- Saghaei, E., Abbaszadeh, F., Naseri, K., Ghorbanpoor, S., Afhami, M., Haeri, A., Rahimi, F., & Jorjani, M. (2013). Estradiol attenuates spinal cord injury-induced pain by suppressing microglial activation in thalamic VPL nuclei of rats. *Neuroscience Research*, 75(4), 316–323.
- Salzer, I., & Boehm, S. (2019). Calcium-activated chloride channels: Potential targets for antinociceptive therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 111, 37–41.
- Scholz, J., Finnerup, N., & Attal, N. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*, 5359.



- Scott, R., Sutton, K., Griffin, A., Stapleton, S., & Currie, K. (1995). Aspects of calcium-activated chloride currents: A neuronal perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 66(3), 535–565.
- Sheets, P., Heers, C., Stoehr, T., & Cummins, T. (2008). Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetilamino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 89–99.
- Shughrue, P., Lane, M., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 388(4), 507–525.
- Sneddon, L. (2019). Evolution of nociception and pain: evidence from fish models. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1785), 20190290.
- Sorge, R., Mapplebeck, J., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J., Martin, L., Austin, J., Sotocinal, S., Chen, D., Yang, M., Shi, X., Huang, H., Pillon, N., Bilan, B., Tu, Y., Klip, A., Ji, R., Zhang, J., ... Mogil, J. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1081–1083.
- Sorge, R., & Totsch, S. (2017). Sex Differences in Pain. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1271–1281.
- St. John Smith, E. (2018). Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of Neurology*, 265(2), 231–238.
- Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K., & Nathans, J. (2002). The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4008–4013.
- Sun, L., Peng, C., Joosten, E., Cheung, C., Tan, F., Jiang, W., & Shen, X. (2021). Spinal Cord Stimulation and Treatment of



Peripheral or Central Neuropathic Pain: Mechanisms and Clinical Application. *Neural Plasticity*, 5607898, 1–9.

- Świeboda, P., Filip, R., Prystupa, A., & Drozd, M. (2013). Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2–7.
- Szok, D., Tajti, J., Nyári, A., & Vécsei, L. (2019). Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. *Behavioural Neurology*, 8685954.
- Tian, X., Ma, K., Wang, X., Wang, Y., Guo, Z., & Si, J. (2018). Effects of the Calcium-Activated Chloride Channel Inhibitors T16A<sub>inh-A01</sub> and CaCC<sub>inh-A01</sub> on Cardiac Fibroblast Function. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(2), 706–716.
- Torrance, N., Smith, B., Bennett, M., & Lee, A. (2006). The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *The Journal of Pain*, 7(4), 281–289.
- Tracey, W. (2017). Nociception. *Current Biology*, 27(4), 129–133.
- Tsunenari, T., Sun, H., Williams, J., Cahill, H., Smallwood, P., Yau, K., & Nathans, J. (2003). Structure-Function Analysis of the Bestrophin Family of Anion Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41114–41125.
- Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., & Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Molecular Pain*, 7(30), 1–17.
- Vacca, V., Marinelli, S., Pieroni, L., Urbani, A., Luvisetto, S., & Pavone, F. (2014). Higher pain perception and lack of recovery from neuropathic pain in females: a behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice. *Pain*, 155(2), 388–402.



- van Hecke, O., Austin, S., Khan, R., Smith, B., & Torrance, N. (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*, 155(4), 654–662.
- Verma, V., Sheikh, Z., & Ahmed, A. (2015). Nociception and role of immune system in pain. *Acta Neurologica Belgica*, 115, 213–220.
- Viswanath, O., Urits, I., Burns, J., Charipova, K., Gress, K., McNally, A., Urman, R., Welschmeyer, A., Berger, A., Kassem, H., Sanchez, M., Kaye, K., Eubanks, T., Cornett, E., & Ngo, A. (2020). Central Neuropathic Mechanisms in Pain Signaling Pathways: Current Evidence and Recommendations. *Advances in Therapy*, 37(5), 1946–1959.
- Vocke, K., Dauner, K., Hahn, A., Ulbrich, A., Broecker, J., Keller, S., Frings, S., & Möhrlein, F. (2013). Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels. *Journal of General Physiology*, 142(4), 381–404.
- von Hehn, C., Baron, R., & Woolf, C. (2012). Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron*, 73(4), 638–652.
- Westlund, K. (2000). Visceral Nociception. *Current Review of Pain*, 4(6), 478–487.
- Woller, S., Eddinger, K., Corr, M., & Yaksh, T. (2017). An Overview of Pathways Encoding Nociception. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 35(107), 40–46.
- Wood, J., Boorman, J., Okuse, K., & Baker, M. (2004). Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 55–71.
- Woolf, C. (2004). Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Physiology in Medicine*, 140, 441–451.
- Woolf, C. (2010). What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742–3744.



- Woolf, C. (2012). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3), S2-15.
- Woolf, C., & Ma, Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364.
- Woolf, C., & Mannion, R. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet*, 353(9168), 1959–1964.
- Xiao, Q., Hartzell, H., & Yu, k. (2010). Bestrophins and Retinopathies. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 460(2), 559–569.
- Xiao, Q., Prussia, A., Yu, K., Cui, Y., & Hartzell, H. (2008). Regulation of Bestrophin Cl Channels by Calcium: Role of the C Terminus. *Journal of General Physiology*, 132(6), 681–692.
- Xiao, Q., Yu, K., Perez-Cornejo, P., Cui, Y., Arreola, J., & Hartzell, H. (2011). Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8891–8896.
- Xie, Y., Luo, H., Zhang, S., Chen, X., Guo, R., Qiu, X., Liu, S., Wu, H., Chen, W., Zhen, H., Ma, Q., Tian, J., Li, S., Chen, X., Han, Q., Duan, S., Shen, C., Yang, F., & Xu, Z. (2022). GPR177 in A-fiber sensory neurons drives diabetic neuropathic pain via WNT-mediated TRPV1 activation. *Science Translational Medicine*, 14(639), 1–13.
- Xu, Z., Chen, Q., Deng, S., Zhang, M., Tan, C., Wang, Y., Ma, K., Li, L., Si, J., & Zhu, L. (2019). 17 $\beta$ -Estradiol Attenuates Neuropathic Pain Caused by Spared Nerve Injury by Upregulating CIC-3 in the Dorsal Root Ganglion of Ovariectomized Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 13.
- Yamagata, K., Sugimura, M., Yoshida, M., Sekine, S., Kawano, A., Oyamaguchi, A., Maegawa, H., & Niwa, H. (2016). Estrogens



Exacerbate Nociceptive Pain via Up-Regulation of TRPV1 and ANO1 in Trigeminal Primary Neurons of Female Rats. *Endocrinology*, 157(11), 4309–4317.

- Yang, J., Wang, H., Chen, J., Li, H., Hu, J., Yu, A., Wen, J., Chen, S., Lai, W., Wang, S., Jin, Y., & Yu, J. (2022). Potential Neuroimmune Interaction in Chronic Pain: A Review on Immune Cells in Peripheral and Central Sensitization. *Frontiers in Pain Research*, 3, 1–13.
- Yang, T., Liu, Q., Kloss, B., Bruni, R., Kalathur, R., Kloppmann, E., Rost, B., Colecraft, H., & Hendrickson, W. (2014). Structure and Selectivity in Bestrophin Ion Channels. *Science*, 346(6207), 355–359.
- Yang, Y., Cho, H., Koo, J., Tak, M., Cho, Y., Shim, W., Park, S., Lee, J., Lee, B., Kim, B., Raouf, R., Shin, Y., & Oh, U. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 455, 1210–1215.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S., Güpür, G., & Muyan, M. (2016). Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 4–20.
- Zamponi, G., Lewis, R., Todorovic, S., Arneric, S., & Snutch, T. (2009). Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain Research Reviews*, 60(1), 84–89.
- Zhang, W., Wu, H., Xu, Q., Chen, S., Sun, L., Jiao, C., Wang, L., Fu, F., Feng, Y., Qian, X., & Chen, X. (2020). Estrogen modulation of pain perception with a novel 17 $\beta$ -estradiol pretreatment regime in ovariectomized rats. *Biology of Sex Differences*, 11(2).
- Zhang, X., Huang, J., & McNaughton, P. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal*, 24(24), 4211–4223.