

Cuernavaca, Mor., 16 de noviembre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Participación de la alarmina HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Rocío Alvarado Mayo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Vinicio Granados Soto



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VINICIO GRANADOS SOTO | Fecha:2021-11-18 13:19:07 | Firmante

fN0p7YXalSMS9xJeP1J1KaPID/CPTb/BRygDySc079dv2gNW6KBbl8qkFXJfnTn3M+TgQQj6wrk2vlg17YsiRLzLWGNM4rfum57WCB1UVIf+kRjy/a2anTHEdcAQ79k5Ld0qaLvyPf
tqzlyweVoz6l66JYzFNMzXmZw6mU6+RU7XGP1xDg03HeQze2C/0ZZimDpVeDx7dwz8Qkl2QjQhas4kND3kdJpwxdlGNP98BpZHDKFOaZa236DOIktUuqvul9ZwheaGtZiIYe8q
aJKqT8WgolL54aL6vVJ73t3PG0BwpBGzjG1xfhaca09B2bUUpQBdVS2Foz8XuNA75X6A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[W2yugYLlr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/smPKj5cf7HQPFYQestCmUiUDxghwNIMd>



Cuernavaca, Mor., 16 de noviembre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Participación de la alarmina HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Rocío Alvarado Mayo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Gabriela Castañeda Corral



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2021-11-16 16:34:35 | Firmante

HICfGDyy8PdfCWYQ6rYwp656voc+9GI4X3/84wd5zCdijymrGD1ebJCImSusGqI968RPUVehywxGMu1FcHU81fT1hTJ4gZi4XfbAaBuTzY2N14UEd5j3KmRnoOnymvWRvKg62HfW/+CLC16bchpqvFTmNTjJ7M+u631D4F3rtcy42I4uNFgSRaHYn9NlbJMHOVazAcOt7zGQB6kGY9P3wxln5fPy9YsRS8yxpVSNJdz3lwVrd1Yw7mzYCJQze/cCAJDCV1Jic7rpcSJHsUuzTX8JfhLtJ5U8fRSV+LK6Zdl618B9yQRa8n6l38Gsy86fVW/pLHwBwbLURsrdJLlow==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[VMr1RTeos](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mHEfGXjOclKHU5oaii2N3dU3REv5pZFf>



Cuernavaca, Mor., 16 de noviembre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Participación de la alarmina HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Rocío Alvarado Mayo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Luz María González Robledo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUZ MARIA GONZALEZ ROBLEDO | Fecha:2021-11-16 14:55:12 | Firmante

p86CHX7QhLlK12Zx3xvS0k45H+qndPmWHz86sVKVjNAAwMBWgstQ/CBw3ORjMZ7WL/0RORJhHe6MI9pa4OAdhLWe40Fw9JvFHNpjF6Cq7lfXLd5RmYcvWF3d7GJdr4QJtcxS
IO0kkgwxG/gq1OeAAIQIEHI3BySw6cobsMmVBZT5nGOEsVMC3jFUOaawAT7k6UtVfCkRht+eMoOJy62sbl+c3aV5znb77nd7Coz87qciBgDCloITgqTRnlnKlKFvBkRSOZ2ScRj
QWFgQDZTVolxIOfttGU6qPH3fwHSnkiX8eCoP44aaDH+nFau7AloY5d6VWab6Fwb5O49d2BAUQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[qCloX8cmG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dRWi61YX5oSpTPrM5BSTRTL496wRXvUc>



Cuernavaca, Mor., 16 de noviembre de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Participación de la alarmina HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Rocío Alvarado Mayo. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Juan José Acevedo Fernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2021-11-16 15:15:33 | Firmante

HfK5zHEjmCWQXaTAqCSKQ/ExAwcnpCSqvpH/+oVWJ2oNycPfv37guyy2Y+4zj1/SQOepQg3enemtSZSfHh/tODoF4Uk24/zE1hAjdrtOML5gmXuMhczwyw/JiETfVh7Wu+OMI53wELBeRHBLmRA6owA8bRRHBUIBH8+J0DYH8DmnMrm/ESZPFGo/Ge2uueez30ZT4iEPGkZgljGLswHP5afX23F7tMBO7sGicdwdOhCdt9Xe7po9WQ8XP3yeWq4Whf+IIHUKm6nP/u7Rnfbml79i98tDd1EtVUDVsrTVIC3QVFDkV49jQb9QvudgHteTGcSf4dnrtQX4/AHkhv2ew==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[prLzX9cZK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/M2bAJ6YtymXquvtjk7AgOk5PNhiKj9pz>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA**



**SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO**

**“Participación de la alarmina HMGB1 en la
hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina
ácida”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA:

Q.F.B. ROCIO ALVARDO MAYO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL

Cuernavaca, Morelos, México a 19 de noviembre de 2021

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Tutor principal:	Dra. Gabriela Castañeda Corral, FM-UAEM
Tutor personal:	Dr. Juan José Acevedo Fernández, FM-UAEM
1er vocal:	Dr. Jesús Santa Olalla Tapia, FM-UAEM
2º vocal:	Dr. Armando Herrera Arellano, FM-UAEM

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Presidente:	Dr. Vinicio Granados Soto, CINVESTAV-IPN
Secretario:	Dr. Armando Herrera Arellano, FM-UAEM
1er vocal	Dr. Juan José Acevedo Fernández, FM-UAEM
2º vocal	Dra. Luz María González Robledo, FM-UAEM
3er vocal	Dra. Gabriela Castañeda Corral, FM-UAEM

LUGAR Y FECHA DE REALIZACIÓN

El presente proyecto se realizó de agosto 2019 a agosto del 2021 en el laboratorio 9 de farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

AGRADECIMIENTO POR EL FINANCIAMIENTO

Para la realización del presente proyecto se contó con el apoyo de la beca de maestría No. **1005853** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) y fue financiado por el proyecto otorgado por CONACyT (A-S140015)

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

I. INDICE DE FIGURAS.....	9
II. ÍNDICE DE TABLA	11
III. LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Dolor	16
1.2. Fisiología del dolor	17
1.2.1. Nocicepción	18
1.2.2. Vías nociceptivas	20
1.3. Clasificación del dolor	26
1.3.1. Clasificación del dolor por duración.....	26
1.3.2. Dolor agudo	26
1.3.3. Dolor crónico	27
1.4. Mecanismos moleculares del dolor crónico.....	32
1.4.1. Sensibilización periférica.....	33
1.4.2. Sensibilización central	35
1.4.3. Facilitación descendente	38
1.4.4. Neuroinflamación	38
1.4.5. Inflamación neurogénica	39
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	42
2.1. Dolor crónico y sistema inmune	42
2.1.1. Receptores de reconocimiento de patrones.....	45
2.2. HMGB1: estructura y función.....	46
2.2.1. Liberación y estados redox de HMGB1	49
2.2.2. Receptores de HMGB1	51
2.3. Participación de HMGB1 en el dolor.....	56

2.3.1. HMGB1 en el dolor agudo	56
2.3.2. HMGB1 en el dolor crónico	62
2.3.3. Dolor crónico por neuropatía diabética y neuropatía inducida por quimioterapia	68
2.3.4. HMGB1 en el dolor inflamatorio crónico	75
3. JUSTIFICACIÓN	79
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	80
5. HIPÓTESIS	80
6. OBJETIVOS	80
6.1. Objetivo general	80
6.2. Objetivos particulares	80
7. METODOLOGÍA.....	81
7.1. Animales	81
7.2. Fármacos	81
7.3. Modelo de hipersensibilidad al dolor inducida por la inyección intramuscular de solución salina ácida	81
7.4. Evaluación de la alodinia mecánica	82
7.5. Diseño experimental	83
7.6. Análisis estadístico.....	88
8. RESULTADOS	89
8.1. Caracterización del curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica inducida por la administración dual de SSA en ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6J.....	89
8.2. Estandarización de la administración de fármacos por vía intratecal	93
8.3. Efecto del inhibidor de HMGB1 glicirricina en la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA	95
8.4. Efecto de la administración intratecal del antagonista del receptor TLR-4 IN-C34 la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA.....	97
8.5. Efecto del antagonista del receptor TLR-5 TH1020 en la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA	99
8.6. Efecto de la administración del antagonista del receptor RAGE en la hipersensibilidad al dolor inducido por solución salina ácida	101
9. DISCUSIÓN.....	103

9.1. Caracterización del modelo inducido por solución salina ácida	103
9.2. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de glicirricina... 106	
9.3. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de TLR4-IN-C34 antagonista del receptor TLR-4.....	108
9.4. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de TH1020 antagonista del receptor TLR5	111
9.5. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de FPS-ZM1 antagonista del receptor RAGE.....	112
10. CONCLUSIÓN.....	115
11. PERSPECTIVAS.....	116
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

I. INDICE DE FIGURAS.....PÁGINA

Figura 1. Principales vías ascendente del dolor.....	22
Figura 2. Vías descendentes..	25
Figura 3. Clasificación del dolor crónico según la IASP.....	29
Figura 4. Regiones anatómicas del cuerpo humano.	30
Figura 5. Sensibilización periférica de los nociceptores.. ..	34
Figura 6 Sensibilización central.....	37
Figura 7. Inflamación neurogénica.....	41
Figura 8. Detección de señales de daño por las células inmunes y los nociceptores, e interacción neuroinmune.	43
Figura 9. Participación de las células del sistema inmune y sus mediadores en diferentes estadios del dolor.....	44
Figura 10. Estructura y función de la proteína HMGB1.	49
Figura 11. Liberación de HMGB1, estados redox y respuesta celular.	51
Figura 12. Vías de transducción de señales asociadas con HMGB1.....	52
Figura 13. Vías de señalización de los receptores TLR.....	55
Figura 14. Diseño experimental para la caracterización del curso temporal del desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la administración de solución salina ácida.	84
Figura 15. Diseño experimental para evaluar el efecto de glicirricina en la alodinia mecánica inducida por solución salina ácida.	85
Figura 16. Diseño experimental para la evaluación de los vehículos y la dosis más alta de los antagonistas de los receptores TLR-4, RAGE y TLR-5 en ratones control inducidos con PBS.	86
Figura 17. Diseño experimental para determinar farmacológicamente a través de que receptor HMGB1 ejerce sus efectos pronociceptivos.	87
Figura 18. Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica inducido por la inyección repetida de solución salina ácida en músculo gastrocnemio de ratones hembra y macho.	90
Figura 19. Efecto del tratamiento agudo con gabapentina y amitriptilina en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida.....	92
Figura 20. Efecto antialodínico de lidocaína y morfina administradas por vía intratecal en dos modelos de dolor crónico.....	94

Figura 21. Efecto de la glicirricina (i.t.) sobre la alodinia mecánica inducido por solución salina ácida (SSA)..	96
Figura 22. Efecto del tratamiento intratecal con el antagonista del receptor TLR-4 IN-C34 en la alodinia mecánica inducida por SSA.	98
Figura 23. Efecto del tratamiento intratecal con el antagonista del receptor TLR-5 TH1020 (i.t.) en la alodinia mecánica inducida por solución salina ácida.	100
Figura 24. Efecto de FPS-ZM1 (i.t.) antagonista del receptor RAGE en la alodinia mecánica inducido por solución salina ácida.	102

II. ÍNDICE DE TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Participación de HMGB1 en el dolor agudo	59
Tabla 2. HMGB1 en el dolor neuropático inducido por métodos quirúrgicos	64
Tabla 3. Participación HMGB1 en la neuropatía diabética y en la neuropatía inducida por quimioterapia.....	71
Tabla 4. Participación de HMGB1 en el dolor inflamatorio crónico	76

III. LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina

aa: Aminoácidos

ABC: Área Bajo la Curva

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: Análisis de Varianza

ARNi: Ácido Ribonucleico de interferencia

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ASIC: Canales Iónicos Sensibles a Ácido

ATP: Adenosín Trifosfato

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

C: Cisteína

Ca²⁺: Ion calcio

CaMK: Proteína Cinasa Dependiente de Ca²⁺/ Calmodulina

CBP: Proteína de unión a CREB

CCA: Corteza del Cíngulo Anterior

CL: Contra lateral

CCI: Constricción Crónica del Nervio Ciático

CCL-2,5: Ligando de Quimioquinas 2

CD14: Grupo de Diferenciación 14

CFA: Adyuvante Completo de Freund

CGRP: Péptido Relacionado con el Gen de Calcitonina

CL: Contralateral

CLR: Receptor de Lectina tipo C

CXCR4: Receptor de Quimiocina 4

DAMP's: Patrones Moleculares Asociados a Daño

DRG: Ganglio de la Raíz Dorsal

g: gramos

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GL: Glicirricina

GPCR: Receptores Acoplados a Proteína G

HMGB1: Proteína de Alta movilidad del Grupo Caja 1

HMGB1_{SH2} o_{all}HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 en estado tiol
HMGB1_{SO₃⁻} o_{ox}HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 en estado oxidado
HMGB1_{S-S} o_{ds}HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 en estado disulfuro
HSP: Proteína de Choque Térmico
i.m.: administración intramuscular
i.p.: administración intraperitoneal
i.t: administración intratecal
IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
ICV: Inyección intracerebroventricular
IFM: Mediadores proinflamatorios
IL: Ipsilateral
IL-1 β , 6: Interleucina 1 β y 6
JAK-STAT: Proteína Cinasa Janus transductora de la señal y activadora de la transcripción
K⁺: Ion potasio
rKA: Receptor Kainato
kDa: Kilodalton
LNS: Ligadura de Nervios Espinales
LPS: Lipopolisacárido
MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno
MCP-1: Proteínas Químico atrayentes de Monocitos 1
mg/Kg: miligramos por kilogramo
mGluR: Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MyD88: Proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88
NA: Noradrenalina
Nav: Canal de sodio dependiente de voltaje
NE: Norepinefrina
NGF: Factor de Crecimiento Neural
NLS: Secuencias de Localización Nuclear
NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico
ns: no significativo
PAG: Sustancia Gris Periacueductal
PAMP's: Patrón Molecular Asociado a Patógenos

PBS: Buffer de Fosfatos Salino
PKA: Proteína Cinasa A
PKC: Proteína Cinasa C
PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones
RAGE: Receptores para Productos Finales de Glicosilación Avanzada
rhtM: Trombomodulina soluble humana recombinante
RVM: Médula Rostral Ventromedial
SEM: error estándar de la media
SI y SII: Sistema Somatosensorial Primario y Secundario
SNC: Sistema Nervioso Central
SNI: Axotomía Parcial del Nervio Ciático
SNP: Sistema Nervioso Periférico
TH: Tirosina hidroxilasa
TIR: Receptor tipo Toll para IL-1
TLR-2: Receptor tipo Toll 2
TLR-4: Receptor tipo Toll 4
TLR-5: Receptor tipo Toll 5
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRIF: Adaptador de interferón- β que contiene el dominio TIR
rTrk: Receptor de Tirosina Cinasa
TRPV1: Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1
TTxR: Canales Resistentes a Tetratoxina
TTxS: Canales Sensibles a Tetratoxina
 μ L: microlitros

RESUMEN

Introducción: El dolor crónico es un problema de salud pública que afecta a más del 20% de la población a nivel mundial y disminuye la calidad de vida del paciente. Los mecanismos moleculares del dolor crónico aún no están bien esclarecidos, no obstante, las moléculas con función neuroinmune son claves en estos procesos. La HMGB1 (por sus siglas en inglés, proteína del grupo de alta movilidad de caja 1) es una “alarmina” que a nivel extracelular facilita procesos nociceptivos en modelos de dolor agudo y crónico, a través de los receptores tipo Toll (TLR-4 y TLR-5) y el receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) principalmente. Sin embargo, no se conoce su participación en el dolor musculoesquelético crónico similar a la fibromialgia.

Objetivos: Evaluar farmacológicamente la participación de HMGB1 y sus receptores TLR-4, TLR-5 y RAGE en la alodinia mecánica inducido por solución salina ácida en ratón.

Material y métodos: Para inducir hipersensibilidad al dolor se utilizó un modelo de fibromialgia experimental inducido por la inyección de solución ácida en el músculo gastrocnemio. El día 9 post-inducción se realizó la evaluación del efecto de dosis crecientes del inhibidor de HMGB1, GL y los antagonistas específicos de los receptores TLR-4 (TLR-4-IN-C34), TLR-5 (TH1020) y RAGE (FPS-ZM1) por vía intratecal en la alodinia mecánica.

Resultados: La administración intratecal de dosis crecientes de GL, inhibidor específico de HMGB1 (0.025-2.5 µg/ratón) o de los antagonistas selectivos TLR-4-IN-C34 (0.04, 4 y 12.5 ng/ratón), TH1020 (1-10 µg/ratón) y FPS-ZM1 (1-10 ng/ratón) revirtieron significativamente y de manera dependiente de la concentración la alodinia mecánica inducida por la inyección de solución salina ácida en el músculo gastrocnemio del ratón.

Conclusiones: HMGB1 participa en la hipersensibilidad inducido por solución ácida y sus efectos sobre la alodinia mecánica podrían estar mediados principalmente a través de los receptores TLR-4, TLR-5 y RAGE.

“Participación de la alarmina HMGB1 en la hipersensibilidad inducida por solución salina ácida”

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Dolor

El dolor es definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *por sus siglas en inglés*) como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial y que puede describirse en términos de dicho daño” (1). Esta definición destaca la influencia de dos componentes importantes en la experiencia del dolor, 1) el componente sensorial, que hace referencia a dónde y cuánto duele, y es conocida como nocicepción; y 2) el componente emocional, que indica cuán desagradable es la experiencia, si causa miedo y/o ansiedad y como responde el individuo a la amenaza que representa el dolor al integrar la información de las emociones con información de experiencias dolorosas previas (2). Ambos componentes son necesarios para integrar y generar la experiencia subjetiva del dolor.

Recientemente un grupo de expertos en el área del dolor, tanto a nivel básico como clínico, han propuesto que la definición requiere modificarse y, sugieren la siguiente definición “el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial”. Esta nueva definición de dolor engloba una serie de puntos que son fundamentales para tener una mejor comprensión del dolor. Además 1) es válida para humano y animales, 2) para el dolor agudo y crónico, y 3) se puede aplicar a todas las condiciones de dolor, independientemente de su fisiopatología (3). En este sentido, el dolor será definido siempre que sea posible desde la perspectiva de quien experimenta el dolor. Lo anterior resalta la importancia del dolor como una experiencia personal que es influenciada en diferentes grados por factores biológicos, psicológicos y sociales (4).

Desde una perspectiva neurobiológica el dolor desempeña una función protectora de alerta temprana, necesaria para detectar y minimizar el contacto con estímulos nocivos como, por ejemplo, el dolor que se presenta tras el contacto con algún objeto demasiado caliente, frío

o punzante. Su función protectora exige una atención y acción inmediata para evitar la lesión o/y salvaguardar la integridad del individuo. Este tipo de dolor se conoce como dolor nociceptivo. El dolor nociceptivo se percibe como algo que debe evitarse y se caracteriza por ser; adaptativo y protector. Un tipo de dolor nociceptivo es el dolor inflamatorio. Este se presenta como consecuencia de una lesión tisular y resulta en un aumento de la sensibilidad sensorial o hipersensibilidad al dolor necesario para reducir el riesgo de daño adicional y promover la recuperación del tejido tras la lesión. En este estado los estímulos inoocuos ahora provocan dolor, lo que lleva a evitar el contacto físico y el movimiento del área lesionada. Sin embargo, cuando el dolor nociceptivo sobrepasa su función protectora, se convierte en patológico. El dolor patológico no desempeña una función protectora ni adaptativa, y se presenta como consecuencia de daño o alteración del funcionamiento del sistema nervioso. Un ejemplo de este tipo de dolor es el dolor neuropático. Sin embargo, es importante destacar que existen condiciones dolorosas en las que no existe daño aparente como en el caso de la fibromialgia, pero que sin embargo cursan con dolor crónico de larga duración en casi todo el cuerpo, un tipo de dolor denominado dolor crónico (5). En consecuencia, las condiciones de dolor crónico disminuyen la actividad física, se asocian a discapacidad y con frecuencia se acompaña de ansiedad, depresión, fatiga y estrés, que afecta de forma significativamente la calidad de vida de quien lo padece (6).

1.2. Fisiología del dolor

La nocicepción es el proceso fisiológico a través del cual se detectan, codifican y procesan los estímulos nocivos a través de los nociceptores (7). Estos son considerados la unidad funcional del sistema nociceptivo. Los nociceptores responden específica y selectivamente a los estímulos nocivos o potencialmente dañino para el organismo (8). Es decir, en condiciones normales, los nociceptores no responden a estímulos “no nocivos” o de baja intensidad como por ejemplo el tacto o la presión ligera (9).

Desde un punto de vista morfofisiológico, los nociceptores son neuronas sensoriales pseudounipolares, cuyo cuerpo celular está localizado en los ganglios de la raíz dorsal (DRG, *por sus siglas en inglés*) o a nivel del ganglio del trigémino (GT). Tienen un único axón que bifurca en dos terminales. La terminal periférica inervar la piel, vísceras, articulaciones y músculos; mientras que la terminal central entra a la médula espinal o al

subnúcleo caudalis del trigémino en donde hace sinapsis con neuronas de segundo orden. En este sitio se realiza el primer relevo de la información nociceptiva de origen periférico (10).

Existen diferentes tipos de neuronas nociceptivas que se clasifican en A β , A δ y C según el tamaño del cuerpo celular, el diámetro del axón, el grado de mielinización y la velocidad de conducción. Los nociceptores de tipo A son aferentes mielinizados que incluyen las fibras A β y A δ , son de diámetro mediano, grandes muy mielinizados y velocidad de conducción intermedias a rápidas que van de 16-100 m/s para las fibras A β y de 5-30 m/s para las A δ , por último las fibras C o no mielinizadas, de diámetro pequeño y velocidad de conducción entre 0.2-2 m/s (11). La mayoría de las fibras A β tienen umbral mecánico bajo y son consideradas receptores del tacto ligero, mientras que las fibras A δ son las encargadas de mediar el dolor agudo bien localizado o rápido. Estas fibras A δ se subdividen en tipo I y tipo II. Las fibras A δ tipo I, son mecanorreceptores de umbral alto que se caracterizan por responder a temperaturas >50°C. Los nociceptores de A δ tipo II, tienen un umbral térmico más bajo (45°C), pero poseen un umbral mecánico muy alto. Las fibras C son nociceptores heterogéneos que incluye una población de fibras sensoriales polimodales, es decir, responden a estímulos de diferentes naturaleza; químico, térmica, eléctrica, mecánico, en contraste a las fibras monomodales que solo responden a un tipo de estímulo nocivo ejemplo de ello son las fibras quimio sensibles que en condiciones normales no responden a los estímulos mecánico o térmicos (10). La activación de las neuronas nociceptivas inicia el proceso de nocicepción (9).

1.2.1. Nocicepción

La nocicepción consta de cuatro procesos importantes; transducción, transmisión, modulación y percepción. Cada uno de estos es descrito a continuación.

A. Traducción

Es el proceso a través del cual el estímulo nocivo se convierte en un potencial de acción. La transducción tiene lugar en la terminal periférica del nociceptor, donde se expresan una amplia variedad de receptores y canales iónicos de sustancias proinflamatorias y proalgésicas. Estos receptores y canales son activados debido a que el cambio en el ambiente

celular, causado por el estímulo nocivo, provoca que en el área lesionada se liberen sustancias pro-algésicas y proinflamatorias. Esto favorece la activación del nociceptor y la entrada de iones que genera una señal eléctrica, es decir, un potencial de acción. El número y frecuencia de los potenciales de acción producidos depende directamente de la intensidad del estímulo nocivo (12). Molecularmente, cuándo un estímulo nocivo activa un canal o receptor como, por ejemplo, los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC) que son canales catiónicos no selectivos de Na^+ y Ca^{2+} , se favorece la apertura del canal lo que permite la entrada de cationes favoreciendo la despolarización del nociceptor. Sí el cambio de gradiente de iones es de magnitud suficiente para alcanzar el umbral de activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Nav), se producirán potenciales de acción (13).

B. Transmisión

Es el proceso que permite que el potencial de acción viaje a lo largo de la vía nociceptiva teniendo como punto de partida la terminal periférica. A partir de este punto el potencial viaja a lo largo del axón del nociceptor hasta llegar a la terminal central ubicada en el asta dorsal de la médula espinal o ganglio trigémino. A este nivel se lleva a cabo el primer relevo de la información nociceptiva, puesto que la terminal central hace sinapsis con la terminal sináptica de una neurona de segundo orden. Sin embargo, el relevo de la información nociceptiva está influenciada por otros tipos neuronales, como por ejemplo interneuronas inhibitorias o excitatorias. La activación de la neurona de segundo orden permite que los potenciales de acción sigan viajando a lo largo de las vías ascendentes hasta llegar a centros supraespinales (10).

C. Modulación

Comprende la regulación de la señal nociceptiva a nivel del asta dorsal de la médula espinal, por diferentes tipos neuronales locales que incluye, interneuronas inhibitorias, excitatorias y terminales axónicas provenientes de centros corticales como las neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas, que en conjunto modulan la transmisión de la información nociceptiva ya sea para inhibirla o amplificarla. La inhibición impide que la señal continúe su curso a través de las neuronas de segundo orden, en otras palabras, la señal proveniente de la periferia ya no se transmite a centros supraespinales;

mientras que la amplificación permite que la información siga su curso hacia regiones corticales y subcorticales (14).

D. Percepción

Es la integración de la información nociceptiva, cognitiva y emocional para generar la experiencia subjetiva del dolor. En este proceso participan diversas estructuras cerebrales, como, amígdala, ínsula y la corteza del cíngulo anterior, regiones se asocia con la experiencia subjetiva del dolor (7, 15).

1.2.2. Vías nociceptivas

Las vías nociceptivas son circuitos neuronales complejos, encargados de llevar la información nociceptiva desde la periferia, a través de la vía aferentes o vía ascendente hasta regiones subcorticales y corticales. Una vez en centros superiores, la información nociceptiva puede activar vías ascendentes que envían aferencias corticales y límbicas al asta dorsal de la médula espinal lo que resulta en la modulación del dolor en la periferia (15, 16). El correcto funcionamiento de estos circuitos neuronales es fundamental para que el dolor cumpla su función fisiológica en el organismo.

1.2.2.1. Vía ascendente

La vía ascendente, es la encargada de transmitir la información nociceptiva proveniente de la periferia, es decir, la señal recibida a través de la terminal periférica del nociceptor, hasta centros supraespinales. Inicialmente la información nociceptiva pasa por el DRG para entrar, a través de la terminal central del nociceptor, a la sustancia gris de la médula espinal a nivel de las láminas superficiales I, II y V. En estas se localizan neuronas de segundo orden cuyos axones cruzan la médula espinal antes de ascender a centros superiores integradores del dolor. El primer centro supraespinal al que llega la información nociceptiva es el tálamo. En este sitio la terminal de la neurona de segundo orden hace sinapsis con neuronas de tercer orden, cuyos axones son enviados a diferentes regiones corticales como la corteza somatosensorial primaria y secundaria (SI y SII), la ínsula, la corteza del cíngulo anterior (CCA), corteza prefrontal y la amígdala (15). Esta conectividad permite que la información nociceptiva sea transmitida a todas estas regiones corticales.

Las principales vías ascendentes son; la vía espinotalámica lateral y la vía espino-parabraquial (Figura 1).

La vía espinotalámica lateral o neoespinotalámico, es la principal vía que transmite información nociceptiva derivada de estímulos térmicos. Esta se ubica de forma antero-lateral dentro de la materia blanca de la médula espinal y, desde ahí, se proyecta al tálamo y posteriormente a la corteza somatosensorial SI y SII a través del tálamo lateral y medial lo que permite discriminar aspectos sensoriales del dolor como la localización, intensidad y tipo de dolor (15).

La información que llega a la vía espino-parabraquial proviene de la lámina I de la médula espinal. Al llegar al tálamo medial, envían proyecciones hacia la corteza cingulada anterior y la ínsula, estructuras importantes que dan el componente motivacional y afectivo que generan la experiencia sensorial y emocional que se percibe como desagradable ante los estímulos dolorosos (17).

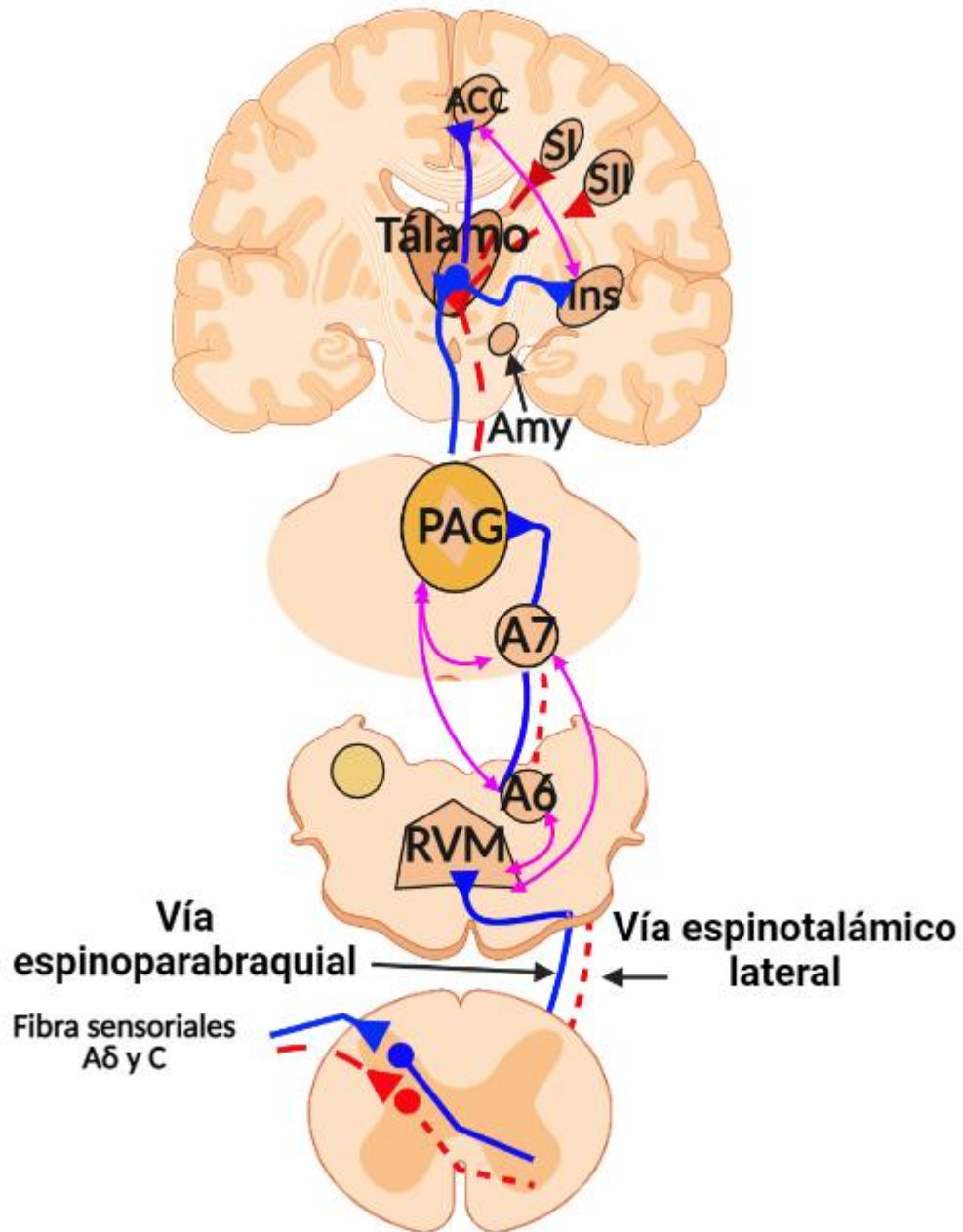


Figura 1. Principales vías ascendente del dolor. La información nociceptiva entra al SNC a través del asta dorsal de la médula espinal donde la fibra sensorial primaria hace sinapsis con neuronas de segundo orden de proyección. Las principales vías ascendentes son la espinotalámica lateral y la espinoparabraquial que se muestran en rojo y azul respectivamente, las flechas rosas de dos puntas indican comunicación bilateral. A6 y A7 son núcleos noradrenérgicos; CCA: corteza del cíngulo anterior; Amy: amígdala; Ins: ínsula; PAG: sustancia periacueductal; RVM: médula rostral ventromedial. Modificada de Ossipov, 2012⁽¹⁸⁾.

1.2.2.1. Vías descendentes

Las vías descendentes del dolor son vías moduladoras que pueden facilitar o inhibir la transmisión de la información nociceptiva a través de la liberación de monoaminas principalmente serotonina, noradrenalina (NA) y dopamina a nivel de la médula espinal figura 2 (19). Estas vía surgen de diferentes sitios supraespinales que incluyen; la sustancia gris periacueductal (PAG), la médula rostral ventromedial (RVM) el núcleo reticular dorso-lateral y el hipotálamo posterior ventricular (18, 20).

Uno de los sitios más importantes en esta vía es la PAG que se encarga de procesar la información nociceptiva de las vías ascendente y descendente. Recibe axones de diferentes sitios corticales como la corteza cingulada anterior, ínsula, amígdala, estructuras límbicas además de los núcleos del tálamo e hipotálamo, la corteza SI y SII que procesan aspectos sensoriales y discriminativo del dolor (18, 19). En cuanto a las entradas nociceptivas que provienen del asta dorsal de la médula espinal son percibidas por los núcleos parabraquiales (21).

La inhibición descendente de la PAG se produce por mecanismos directos e indirectos asociados a la liberación de opioides endógenos (18). Además, la PAG tiene conexiones reciprocas con la RVM. La excitación de las neuronas de la PAG incrementa la actividad de las neuronas de la RVM (21). Es por ello que las proyecciones nacientes en PAG llegan a la RVM y no directamente a la médula espinal, por lo tanto, la RVM es quien envía salidas axónicas a las láminas superficiales y profundas del asta dorsal de la médula espinal, al igual que las terminales que se originan los núcleos del tronco encefálico como el núcleo rafe Magnus, núcleos A5, A6 y A7 que son proyecciones noradrenérgicas y serotoninérgicas (19).

Las terminales que se originan en la RVM y otros núcleos del tronco encefálico cerebral hacen sinapsis con la terminal central del nociceptor, interneuronas y neuronas de proyección en la asta dorsal donde varios neurotransmisores son liberados, pero la serotonina (5-HT) y NA son las principales monoaminas liberadas a partir de las vías descendentes. La fuente serotoninérgica surge de la RVM, pero predomina a nivel del núcleo rafe Magnus, la liberación de 5-HT causa la hiperpolarización de las terminales de las fibras nociceptivas aferentes y neuronas de proyección del asta dorsal cuando

interactúan con los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₇ (22) y se produce excitación de interneuronas GABAérgicas espinales cuando interactúa con el receptor 5-HT₃ (23, 24). Las neuronas adrenérgicas surgen de los núcleos medulares C1 y C2 como por los núcleos noradrenérgicos localizados en A5 y A6 en el locus coeruleus y las regiones pontinas A7 en el subcoeruleus. La liberación de NA produce hiperpolarización en las neuronas de proyección al interactuar con los receptores alfa-2A (α -2A) (25). Y sobre las terminales de los aferentes cuando interactúa con los receptores alfa-2B/C y la interacción con los receptores α -1A excita las interneuronas inhibitoras del asta dorsal de la médula espinal (26).

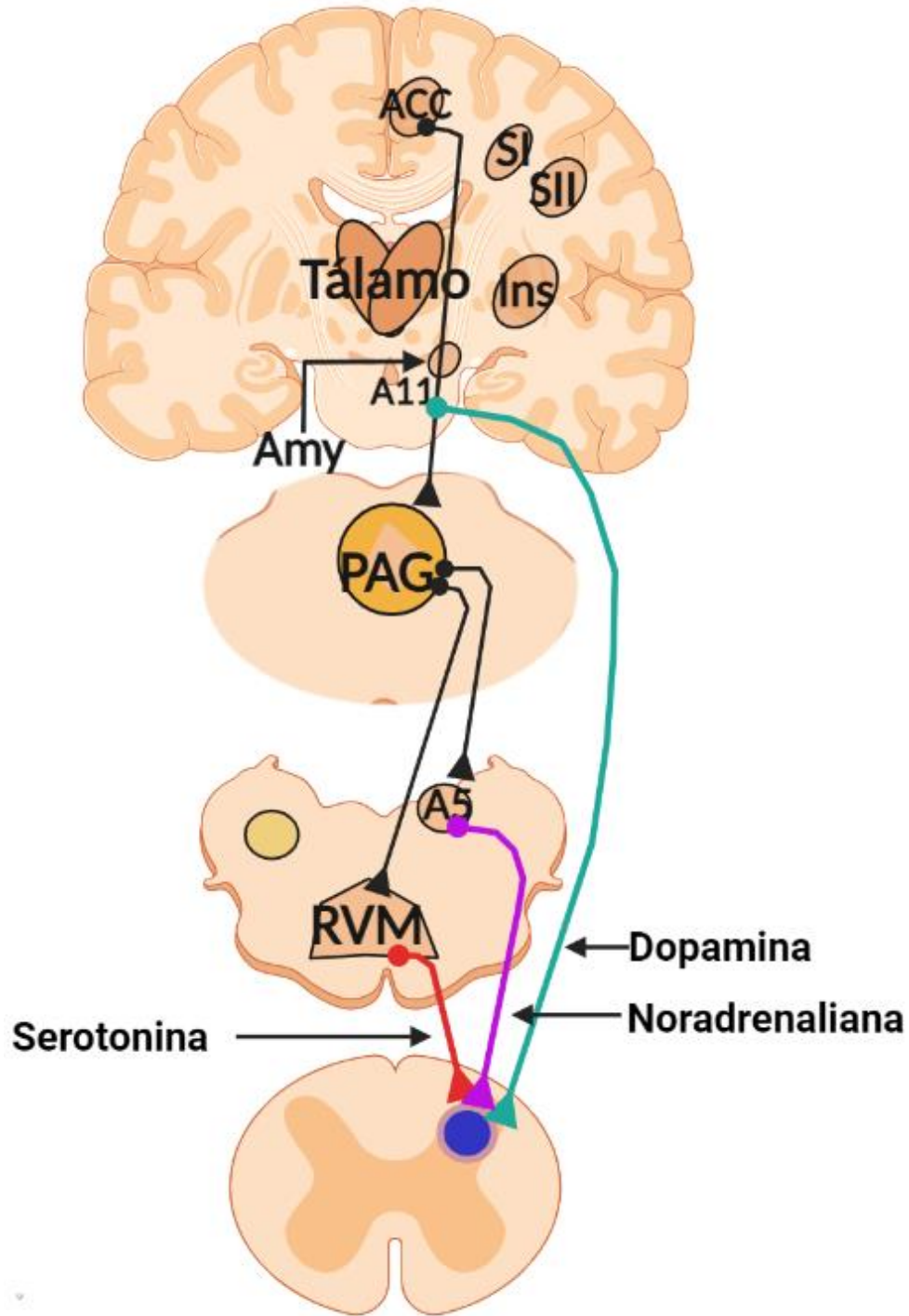


Figura 2. Vías descendentes. Las proyecciones descendentes se muestran en verde, morado y rojo, mientras que las flechas negras indican comunicación bilateral. Las proyecciones desde la RVM a la médula espinal sugieren inhibición y facilitación descendentes. A6 y A7 son núcleos noradrenérgicos; ACC: corteza del cíngulo anterior; Amy: amígdala; Ins: ínsula; PAG: gris periacueductal; RVM: médula rostral ventromedial. Modificada de Ossipov, 2012⁽¹⁸⁾.

En ausencia de condición patológica dolorosa la vía descendente es principalmente inhibitoria, por lo tanto, la información nociceptiva es inhibida a nivel de la médula espinal por liberación de neurotransmisores inhibidores como glicina, opioides endógenos y GABA (18), pero se produce un desajuste en condición patológica que altera la funcionalidad de la vía descendente que ahora facilita el paso de la información nociceptiva a centros corticales (19).

1.3. Clasificación del dolor

Desde décadas pasadas, se ha buscado estrategias para clasificar al dolor, facilitar su estudio y tratamiento. En la actualidad existen varios criterios para clasificar al dolor, a) por su duración, se clasifican en agudo o crónico, b) por su localización en somático o visceral, c) por su origen en nociceptivo, inflamatorio, neuropático o disfuncional (5). Sin embargo, este sistema de clasificación no logra incorporar la amplia variedad de condiciones que cursan o desarrollan un estado doloroso. Estas limitaciones, llevaron a que, en años recientes, expertos en el área del dolor realizaran una clasificación sistemática que engloba los padecimientos patológicos que presentan un componente doloroso (27).

1.3.1. Clasificación del dolor por duración

El dolor puede ser agudo o crónico. El dolor agudo actúa como señal de alarma instantánea en el individuo y, por lo tanto, es el dolor fisiológico necesario para la supervivencia del organismo, mientras que el dolor crónico es una condición patológica que no presenta una función adaptativa ni protectora para el individuo (28).

1.3.2. Dolor agudo

El dolor agudo es una respuesta rápida, adaptativa y transitoria que inicia en respuesta a algún estímulo nocivo, que daña o amenaza con dañar los tejidos, y que desaparece junto al estímulo que lo inició o bien con la reparación del tejido. (29). Este dolor es necesario para proteger al organismo, es decir, fisiológicamente actúa como una señal de advertencia. Por lo tanto, clínicamente este dolor no persiste por más de tres meses (30).

1.3.3. Dolor crónico

El dolor crónico, es aquel dolor que persiste más allá del periodo normal de curación y carece del propósito fisiológico de advertencia. Desde el punto de vista clínico es un periodo mayor de 3 a 6 meses (31). Actualmente se estima que afecta a más del 20% de la población mundial, mientras que un 10% recibe un diagnóstico de dolor crónico cada año (32). El dolor crónico es la principal causa de discapacidad y sufrimiento que se acompaña de alteraciones emocionales que impactan en la intensidad del dolor que se percibe lo cual repercute sobre la calidad de vida (33).

Una de las manifestaciones clínicas del dolor es la presencia de hipersensibilidad nociceptiva que se caracteriza por la parencia de alodinia (respuesta dolorosa ante los estímulos inocuos) e hiperalgesia (los estímulos dolorosos son percibidos con mayor intensidad) Es decir, el dolor crónico produce un estado de hiperexcitabilidad del sistema nerviosos que disminuye el umbral de activación de los nociceptores para favorecer el dolor (34).

Actualmente existen muchas condiciones patológicas que cursan con un estado de dolor crónico es por ello que la IASP recientemente propuso una nueva clasificación del dolor crónico, cuya finalidad es poder ser aplicada en los servicios de atención primaria, así como en entornos especializados en el manejo del dolor. En esta clasificación los síndromes que cursan con dolor crónico se engloban en 7 categorías principales y se distinguen entre el dolor crónico primario (1 categoría) y el dolor crónico secundario (6 categorías) figura 3 (27).

El dolor crónico primario se considera una enfermedad por sí mismo y se define como el dolor presente por más de 3 meses en una o más regiones anatómicas, este dolor no puede ser explicado por otra condición de dolor crónico y está asociado con angustia emocional, discapacidad funcional significativa que interfieren con las actividades de la vida diaria y participación en roles sociales (31).

Las condiciones de dolor crónico primario que pertenece a la categoría número uno (1) se encuentra: I) el dolor musculoesquelético crónico primario, II) el dolor crónico generalizado, III) síndrome de doloroso regional complejo, IV) la cefalea crónica primaria o dolor orofacial y, V) dolor visceral crónico primario (27).

En contraste el dolor crónico secundario se considera un síntoma de otra enfermedad la cual es la causa subyacente, en donde la mayoría de las ocasiones el dolor es el síntoma más debilitante y requiere tratamiento. Sin embargo la mayoría de los casos el dolor crónico secundario continua aun después del éxito en el tratamiento de la afección inicial (27). En esta clasificación de la IASP, el dolor crónico secundario engloba seis grandes categorías (2-7) que incluyen: (2) dolor crónico asociado a cáncer, es decir, el dolor que se origina por la presencia del tumor o como resultado del tratamiento del mismo; (3) el dolor crónico post-quirúrgico o postraumático, se caracteriza por ser un dolor que persiste más allá de la sanación del tejido lesionado como consecuencia de un traumatismo o cirugía; (4) dolor neuropático crónico, se origina por enfermedad o daño directo ocasionado al sistema somatosensorial y puede tener origen a nivel periférico o central, según la ubicación del daño; (5) cefalea crónica secundaria o dolor orofacial, este dolor se presenta durante más de 2 horas al día y en un 50% de los días en un periodo de tres meses; (6) dolor visceral crónico secundario, caracterizado por ser persistente o recurrente con origen en órganos internos de la cabeza, cuello, la cavidad torácica, abdominal y pélvica; y (7) el dolor musculoesquelético crónico secundario, es aquel que afecta de forma directa a los huesos, articulaciones, los músculos o los tejidos blandos, este tipo de dolor se presenta de forma espontánea o inducido por el movimiento (27). Esto ha dado senda a que la enfermedad subyacente debe ser tratada como objetivo primario.

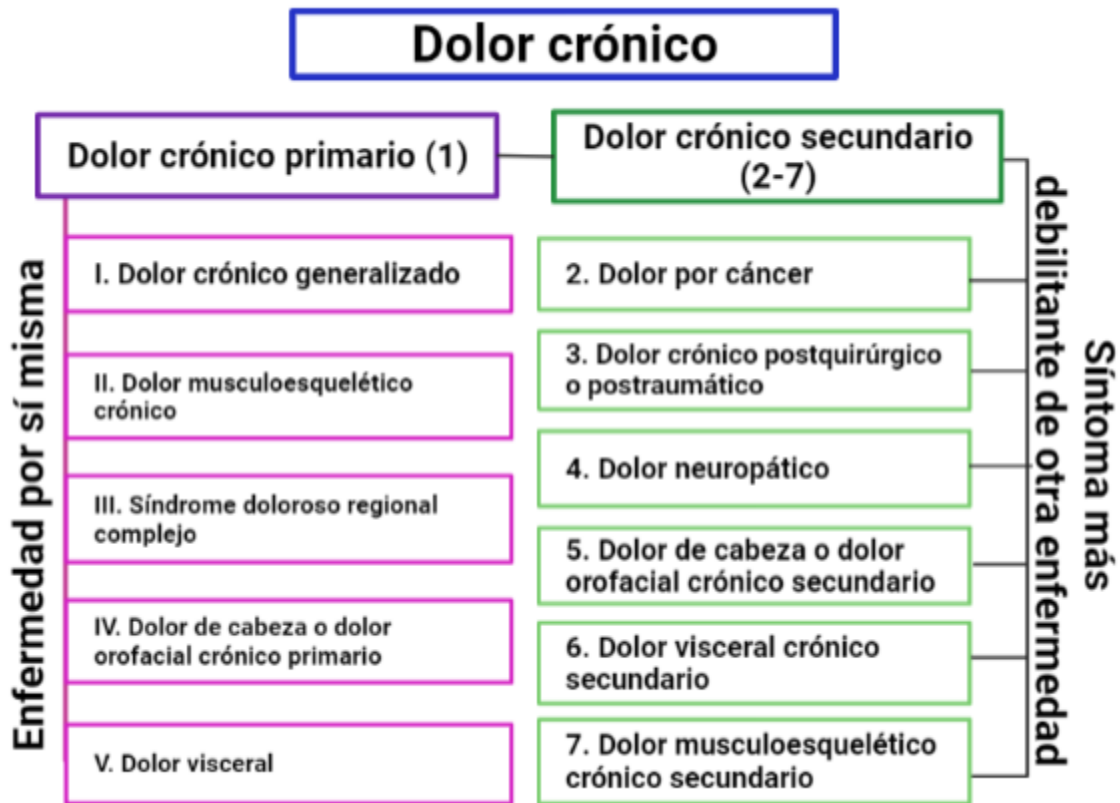


Figura 3. Clasificación del dolor crónico según la IASP. Modificado de Treede *et al.*, 2019 ⁽²⁷⁾.

En el sistema de clasificación del dolor crónico primario las patologías pueden presentar una etiología y fisiopatología no esclarecida. Por lo tanto, la presencia de dolor puede percibirse en cualquier sistema del cuerpo, por ejemplo, el sistema nervioso, musculoesquelético y gastrointestinal; o bien en cualquier parte del cuerpo como la cara, espalda baja, cuello, miembros superiores, tórax, área abdominal, pelvis y región urogenital; o por la combinación de regiones del cuerpo. Tal es el caso del dolor crónico generalizado que se presenta en la fibromialgia (35).

1.3.3.1. Fibromialgia

La fibromialgia, es el síndrome de dolor crónico primario más frecuente, cuya manifestación cardinal es el dolor musculoesquelético crónico generalizado (36) que se describe como dolor en al menos 4 de las 5 regiones corporales (región inferior derecha; región superior derecha, región axial; región superior izquierda y la región inferior izquierda) (Figura 4), que se acompaña de hipersensibilidad al dolor (alodinia e

hiperalgesia) fatiga, trastornos cognitivos así como alteraciones del sueño (37). Estos síntomas se presentan en un nivel similar durante al menos 3 meses y los cuales no se explican mejor por otra condición de dolor crónico (35). Mientras que los trastornos del estado de ánimo y la ansiedad son comorbilidades comunes de esta enfermedad (38) que inciden en una mayor sensibilidad al dolor (39).

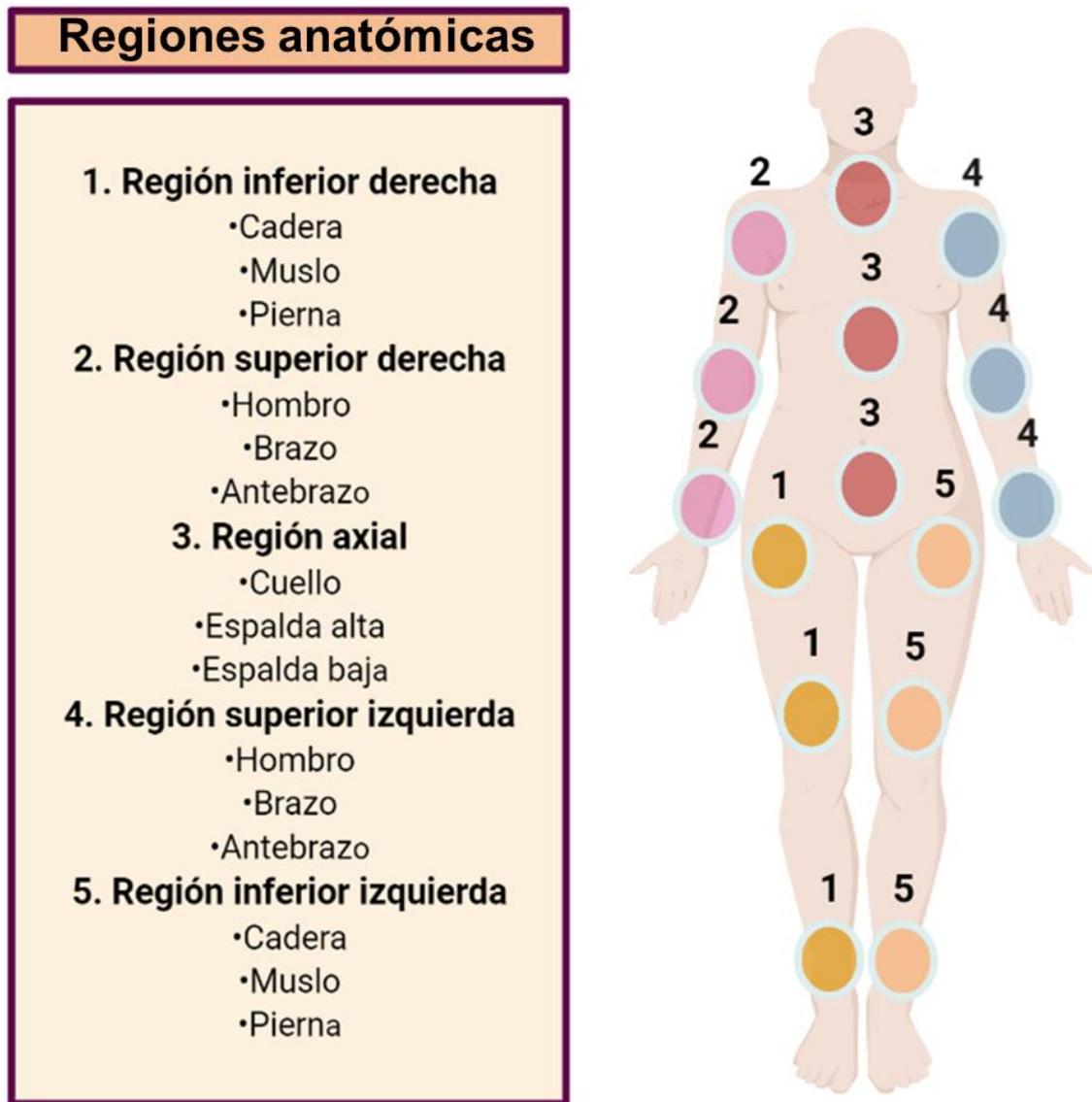


Figura 4. Regiones anatómicas del cuerpo humano.

1.3.3.2. Epidemiología

La fibromialgia, es un problema de salud pública con una prevalencia que oscila entre el 1.3 y el 8% a nivel mundial, con un promedio aproximado del 2.1%, siendo más común en personas de mediana edad principalmente mujeres de 20-55 años (40-42). La prevalencia media es mayor en las mujeres (4.3%) con respecto a los hombres (0.95%), lo que establece una proporción de 4:1 en mujeres/hombres a nivel global (42).

En México, en un estudio publicado en el 2011, se reportó que la prevalencia se encuentra entre 0.08 y 1.7%. Al igual que en el resto del mundo, la fibromialgia en México predomina en mujeres con un 0.8% en comparación con los hombres con 0.4% (43).

1.3.3.3. Síntomas de la fibromialgia

El síntoma cardinal de la fibromialgia es el dolor crónico generalizado, es decir, la presencia de dolor en todo el cuerpo. Este dolor muscular es profundo, intenso, quemante y persistente, de naturaleza bilateral que afecta las áreas corporales superiores e inferiores y el eje central (27).

Los síntomas no dolorosos asociados a la fibromialgia son; fatiga, trastornos del sueño, síntomas somáticos y deterioro del estado de ánimo. Entre estos síntomas, la astenia, la fatiga y los problemas de sueño son síntomas claves presentes en la mayoría de los pacientes con fibromialgia capaces de limitar su actividad física (44).

Estos síntomas se presentan desde el despertar, mejorar durante el transcurso del día, pero vuelve a reaparecer por la tarde (45).

Los trastornos del sueño se deben al sueño no reparador, debido a la dificultad de conciliar el sueño por incremento de los despertares nocturnos y fragmentación del sueño (46). La presencia de trastornos del sueño se asocia al desarrollo de dolor crónico que, a largo plazo, favorece la hipersensibilidad al dolor, sin embargo, la fibromialgia puede ser la causa o consecuencia de la aparición de estos trastornos (47).

Los trastornos cognitivos se refieren a alteraciones como déficit de atención, disminución de la capacidad para centrar la atención, menor capacidad de recordar nuevos datos y, dificultad para realizar tareas simples y complejas (48).

En las alteraciones en el estado de ánimo, encontramos particularmente a la ansiedad y depresión, que pueden agravar el síndrome de dolor crónico y viceversa. Es por ello que el tratamiento para estas alteraciones es indispensable en los pacientes con fibromialgia (49).

Además, se puede presentar dolor de cabeza intenso o muy severo que los pacientes describen como “se me parte la cabeza”. Incluso se pueden presentar parestesias (entumecimiento y hormigueo) en ambas extremidades de los brazos y piernas, síndrome gastrointestinal, reflujo gastroesofágico, ojos secos entre otros (50).

Es importante hacer mención que la fibromialgia por sí sola no pone en peligro la vida del paciente, sin embargo, es una enfermedad altamente incapacitante que disminuye la calidad de vida por la gran variedad de síntomas que la acompañan, pero sobre todo por la falta de un tratamiento eficaz (51).

1.4. Mecanismos moleculares del dolor crónico

Actualmente no se ha logrado esclarecer los mecanismos exactos que perpetúan el dolor crónico presente en condiciones patológicas como la fibromialgia o el dolor neuropático. Sin embargo, se sugiere que su desarrollo y mantenimiento se debe a cambios producidos en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) que conducen a alteraciones en el correcto procesamiento del dolor, desequilibrio neuroquímico a nivel central con amplificación de la percepción del dolor, iniciado por procesos de sensibilización periférica y central, que disminuyen el umbral de activación de los nociceptores (A δ y C) dando paso a que los estímulos de bajo umbral o subumbrales generen una respuesta nociceptiva (52). Mientras que las alteraciones en el funcionamiento de las vías monoaminérgicas descendentes facilitan el paso de la información nociceptiva a centros corticales (19).

La participación del sistema inmune en estos procesos es a través del fenómeno conocido como neuroinflamación (53). Además, las células del sistema nervioso puede iniciar la activación del sistema inmune a través de la inflamación neurogénica (54). En conjunto, todos los mecanismos mencionados mantienen el estado de dolor crónico por medio de la hipersensibilidad del SNC, pero sin lograr explicar la totalidad de los síntomas observados en un estado de dolor crónico (40).

1.4.1. Sensibilización periférica

La sensibilidad periférica es la disminución del umbral de activación de los nociceptores a nivel periférico, que es causa y consecuencia del daño tisular y/o inflamación (55). Esta elevada excitabilidad del nociceptor está limitada al área de lesión, representa una forma de dolor evocado que requiere de una lesión periférica en curso y umbrales de dolor que se refleja en una mayor respuesta a los estímulos de presión y calor (56).

La sensibilización periférica es producida por la liberación de los mediadores inflamatorios liberados como consecuencia de daño tisular o nervioso, por las células residentes del tejido o por las propias células inmunes (macrófagos, mastocitos, dendritas). Después de la lesión se incrementa la concentración de protones (H^+) y del trifosfato de adenosina (ATP) que incrementa la acidez del medio extracelular, generando señales de daño que son reconocidas por células adyacentes. Se induce la liberación de eicosanoides como las prostaglandinas (PG's) y de aminas vasoactivas como bradicinina (BK), histamina, serotonina (5-HT) y NA que favorecen la vasodilatación y contribuyen a la extravasación de células del sistema inmune como los neutrófilos y linfocitos T (54).

Los mediadores liberados actúan en receptores específicos ubicados en la terminal o soma del nociceptor que inducen la activación de diferentes vías de transducción de señales que incrementan la producción de segundos mensajeros como el calcio (Ca^{2+}) y el adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) que activan varias cinasas como la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA), la cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK), la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K), la familia de proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK) como son: la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), p38-MAPK y cinasa Janus N-terminal (JNK). La activación de estas cinasas produce cambios a corto y largo plazo en el nociceptor. A corto plazo, se fosforilan canales iónicos como el receptor de potencial transitorio vanilloide 1 (TRPV1) y los canales de sodio activados por voltaje Nav.1.7, Nav1.8 y Nav1.9. A largo plazo, se incrementa la transcripción y expresión de canales, particularmente canales de sodio activados por voltaje. Ambos fenómenos favorecen la entrada de sodio al interior de la neurona, incrementando la frecuencia de potenciales de acción que favorece la hiperexcitabilidad del nociceptor y la transmisión de la información nociceptiva desde la periferia al SNC (Figura 5) (57).

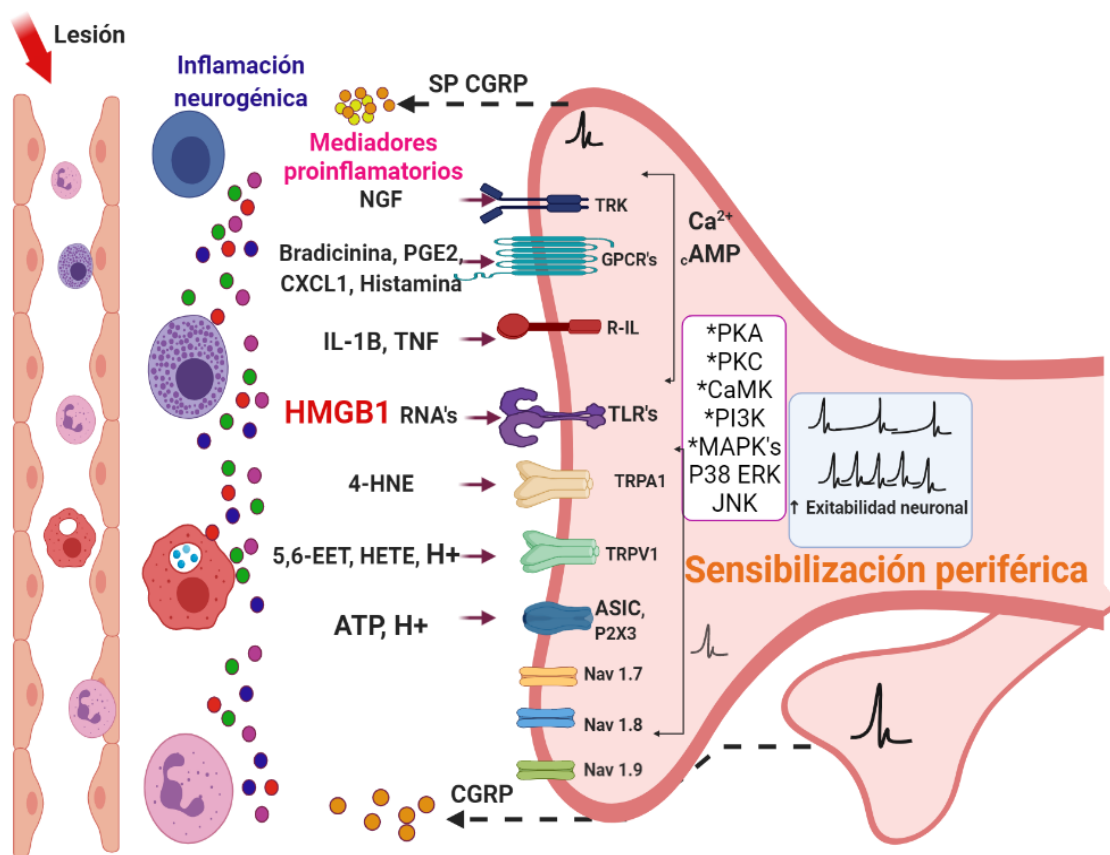


Figura 5. Sensibilización periférica de los nociceptores. La disminución del umbral de activación de los nociceptores y el incremento en la producción de los potenciales de acción se da por mediadores proinflamatorios liberados de las células inmunes, las células del tejido dañado y los propios nociceptores. Estos mediadores actúan en sus receptores ubicados en la terminal del nociceptor. 4-HNE: 4-hidroxinonal; ASIC: canal de iones sensibles a ácido; ATP: adenosín trifosfato; Ca^{2+} : calcio; CCL2: quimiocina (motivo CC) ligando 2; CCL5: quimiocina (motivo CC) ligando 5; CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; CXCL1: quimiocina (motivo CXC) ligando 1; FPR1: receptor de péptido de formilo 1; GPCR: receptor acoplado de proteína G; H^+ : hidrogeno; HETE: hidróxido del ácido tetraenóico; HMGB1: proteína del grupo de alta movilidad de caja 1; IL-1 β : interleucina 1 beta; NGF: factor de crecimiento neural; P2X3, receptor purinérgico; PGE2: prostaglandina E2; RNA: ácido ribonucleico; RTK: receptor tirosina cinasa; TNF: factor de necrosis tumoral; TRPV1: receptor transitorio potencial Vanilloide 1. Modificado de Ji *et al.*, 2014 ⁽⁵⁷⁾.

El incremento en la frecuencia de potenciales de acción en el nociceptor induce la liberación de péptidos vasoactivos como, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P (SP) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento neural (NGF). Tanto la SP como el CGRP al ser liberados actúan en sus respectivos receptores ubicados en los vasos sanguíneos y en las células inmunes en donde favorecen la vasodilatación y extravasación plasmática con infiltración de células inmunes (54).

1.4.2. Sensibilización central

La sensibilización central es la amplificación de la información nociceptiva proveniente de la periferia que resulta una mayor capacidad de respuesta de las neuronas espinales dando lugar a un estado de hiperexcitabilidad, expansión del campo receptivo y mayor sensibilidad a los estímulos dolorosos (58). Adicionalmente las fibras aferentes no nociceptivas, las fibras A β , se acoplan al circuito del dolor, dando lugar a que los estímulos inocuos o no dolorosos ahora sean percibidos como dolorosos (9).

La sensibilización central es una manifestación de plasticidad dada por el aumento en la transmisión sináptica, impulsada por la activación de los receptores del glutamato como N-metil-D-aspartato (NMDA) y representa un incremento en la excitabilidad neuronal además de una reducción de la transmisión inhibitoria por pérdida de interneuronas inhibitorias lo que resulta en la disminución de la síntesis y actividad de los neurotransmisores, lo que está asociado en el aumento de la sensibilidad al dolor de forma persistente (58, 59).

El proceso de la sensibilización central comprende dos fases temporales, cada una con mecanismos específicos. Por un lado, la fase temprana, depende de la fosforilación de canales iónicos y receptores de glutamato como: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), NMDA y Kaínato, así como los diferentes subtipos de receptores metabotrópicos del glutamato que están acoplados a proteínas G (mGluR), los cuales son canales y receptores importante en el inicio y el mantenimiento de la sensibilización central. La activación de los nociceptores libera una amplia variedad de neurotransmisores en la terminal central que incluye: el glutamato, la SP, CGRP y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en la sinapsis que hace con las neuronas de segundo orden ubicadas en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal. Como consecuencia, el ion Mg²⁺ ubicado en el poro del receptor NMDA es removido para permitir su activación. En estas condiciones se envían señales postsinápticas que aumentan el Ca²⁺ intracelular, aunque este incremento también puede provenir de la activación de otros canales iónicos como AMPA o de los receptores mGluR1 y 5 que están acoplados a proteínas G α_q , lo que resulta en la activación de diferentes cinasas como p38-MAPK, PKA y PKC. Estos eventos intracelulares aumentan la excitabilidad de las neuronas de segundo orden y facilitan la transmisión de la señal nociceptiva. Por otro lado, se produce una disminución de los efectos inhibitorios de

la transmisión sináptica mediados por GABA y glicina, así como de los producidos por NA y la 5-HT en los circuitos del dolor a nivel de la médula espinal (56, 60).

que la segunda fase es más duradera y dependiente de la transcripción, que impulsa la síntesis de las nuevas proteínas responsables de mantener la sensibilización central presente en muchas condiciones patológicas (56, 61).

La segunda fase es más duradera y depende de la transcripción de nuevas proteínas como los neuropéptidos reguladores del dolor como la SP, BDNF y neurocininas A y B. Estos neuropéptidos se liberan en mayor concentración en el espacio extracelular de las terminales nerviosas de los aferentes primarios, lo que promueve la activación de sus respectivos receptores en las neuronas (Figura 6). La acción de los neurotransmisores liberados de la terminal central del nociceptor es modulada por los receptores opioides μ , δ y κ , así como por diferentes los receptores serotoninérgicos y noradrenérgicos (62, 63).

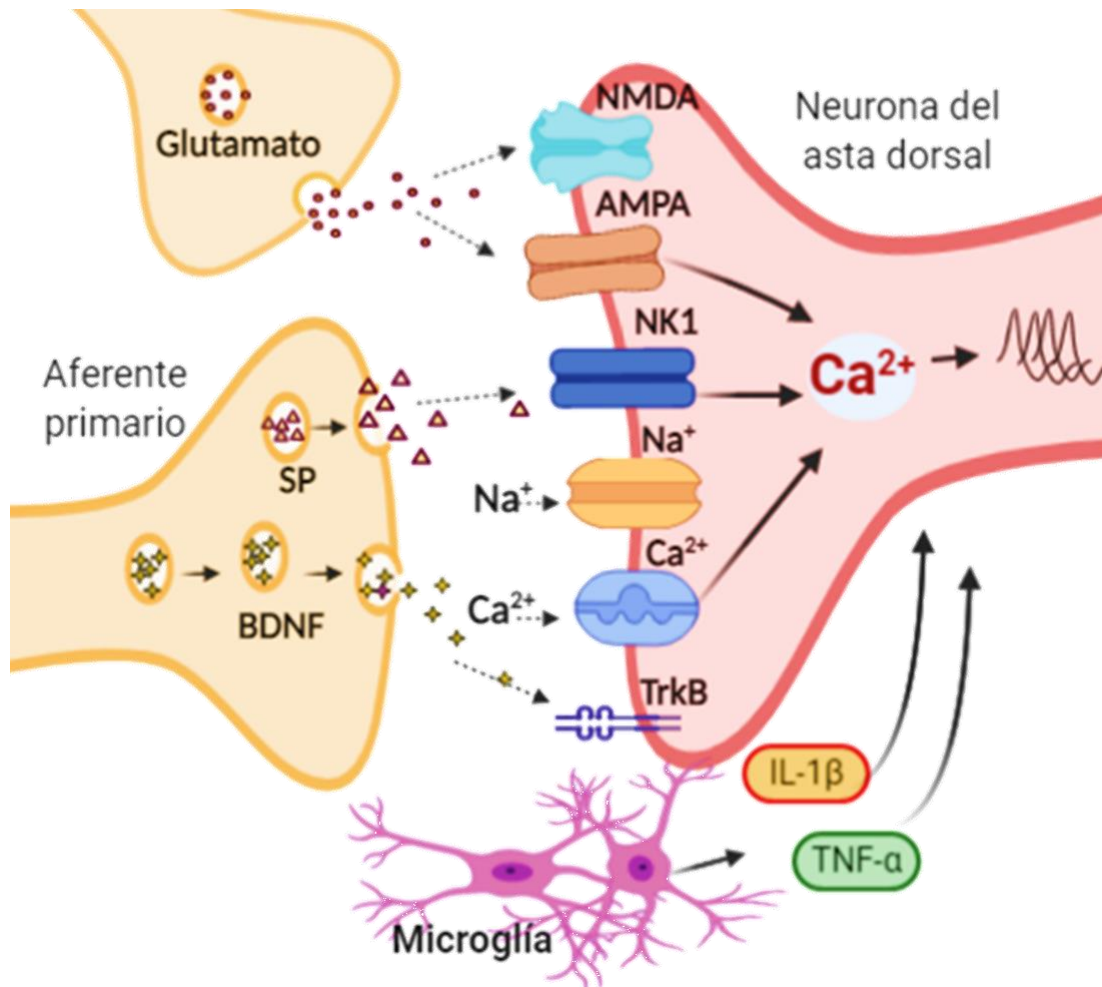


Figura 6 Sensibilización central. La entrada continua de información nociceptiva a través de las fibras C produce la liberación de neurotransmisores de la terminal central que activaran a sus respectivos receptores ubicados en la terminal postsináptica de las neuronas de segundo orden. Esto ocasiona un aumento de Ca^{2+} que activa a proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} intracelular que favorece la activación de diferentes cinasas dependientes de Ca^{2+} . Estas cinasas fosforilan receptores y canales lo que favorece la excitabilidad neuronal y la transmisión de la información nociceptiva. En este proceso también se activan las células de la glía (microglía y astrocitos) que en este estado liberan una variedad de moléculas proinflamatorias. BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, TNF α : factor de necrosis tumoral α ; IL-1: interleucina 1; SP: sustancia P; AMPA: receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato; Ca_v : canal de calcio dependiente de voltaje; Na_v : canal de sodio dependiente de voltaje; NK1: receptor de neurocinina 1. Modificado de Luo *et al.*, 2014 ⁽⁶³⁾.

El efecto general de la sensibilización central es generar cambios en el umbral y cinética de activación de los receptores NMDA y AMPA que lleva a un incremento de la excitabilidad neuronal, mientras que los cambios en el tráfico de los receptores AMPA así como las alteraciones en los canales iónicos producen incremento en las corrientes de entrada y disminuye su salida lo que facilita la transmisión sináptica, la disminución de la liberación de GABA y glicina favorece el paso de la señal nociceptiva. Estos mecanismos

se reflejan en el desarrollo o incremento de actividad espontánea, disminución en el umbral de activación e incremento de campo receptivo de la neurona nociceptiva. Por lo tanto, la sensibilización central es responsable de la hiperalgesia secundaria (aumento de la sensibilidad al dolor fuera del área de la lesión), la sensación de dolor a la palpación y la alodinia táctil que es el dolor en respuesta al tacto ligero el cual es un componente común en el dolor crónico inflamatorio y neuropático disfuncional como la fibromialgia (59).

1.4.3. Facilitación descendente

La facilitación descendente se debe a cambios en la excitabilidad, el fenotipo, la plasticidad de las interneuronas inhibitorias y los sistemas moduladores descendentes que en conjunto incrementan la excitabilidad del SNC. Sitios como la gris periacueductal, el locus coeruleus y RVM son claves en el rendimiento final de la información nociceptiva a nivel de la asta dorsal de la médula espinal, siendo la RVM el último sitio del relevo de la información nociceptiva al enviar proyecciones descendentes a nivel de la médula espinal (64).

La mayoría de las entradas que provienen de la RVM son GABAérgicas y opioidérgicas duales que proyectan a través del funículo dorsolateral e inervan la asta dorsal, es decir, puede inhibir o facilitar la transmisión de la información nociceptiva. Estudios recientes muestran que las neuronas GABAérgicas de la RVM están implicadas en la facilitación del dolor a través de la inhibición de las interneuronas encefalinérgicas/GABAérgicas del asta dorsal al controlar las entradas sensoriales a través de la inhibición presináptica (65). Así también, la eliminación de neuronas que poseen receptores μ -opioides es clave para eliminar la influencia facilitadora descendente sobre el procesamiento nociceptivo espinal (66). Mientras que las neuronas del núcleo del locus coeruleus que proyectan a las láminas I, II y V de la médula espinal modulan directamente el dolor a través de mecanismos que implican potenciar el efecto generado por los opioides (67).

1.4.4. Neuroinflamación

La neuroinflamación es una inflamación localizada que puede ocurrir en el sistema nervioso periférico o a nivel central y que presenta las siguientes características: 1) aumento en la permeabilidad vascular, 2) infiltración de leucocitos, 3) activación de células gliales y 4) aumento en la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas.

El estado de neuroinflamación favorece la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que permite la infiltración de células del sistema inmune provenientes de la periferia hacia el interior del SNC. La neuroinflamación impulsa y/o mantiene el estado de sensibilización central presente en el dolor crónico por activación de las células gliales como la microglía, los astrocitos en la médula espinal y el cerebro, lo que promueve la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (57, 60).

El tráfico de células del sistema inmune a nivel periférico tiene diferentes perfiles temporales; el tráfico inicial de neutrófilos se produce en un lapso de horas posterior a la lesión, le sigue el tráfico de macrófagos que se produce en el transcurso de días, mientras que la infiltración de células T se produce en un lapso de semanas (68). Por otro lado, en las lesiones que implican un daño directo al nervio a nivel periférico, el curso temporal de la respuesta se manifiesta con la activación de células de Schwann a nivel del nervio y células gliales satélite en los ganglios, la microglía, astrocitos y oligodendrocitos en la médula espinal (69). En las lesiones a nivel central la microglía es probablemente la primera célula en responder (días) y posteriormente le siguen los astrocitos (días a semanas) (70).

La neuroinflamación al ser una inflamación local es capaz de inducir y mantener el dolor, sin embargo, es una inflamación difícil de detectar clínicamente. Ejemplo de ello es la fibromialgia, enfermedad que anteriormente se consideraba una condición de dolor atípico, puesto que no se lograba detectar inflamación evidente. Sin embargo, estudios recientes muestran que existe una neuropatía de fibras nerviosas pequeñas que puede ser el resultado y causa de la neuroinflamación (71, 72).

1.4.5. Inflamación neurogénica

La inflamación neurogénica es el proceso fisiológico a través del cual las fibras nerviosas sensoriales, distales y proximales liberan neuropéptidos para inducir vasodilatación antidrómica como resultado de la activación de la terminal periférica por despolarización local, reflejos axonales o reflejos de la raíz dorsal. Los neuropéptidos que se liberan de forma abundante son, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la SP. Los principales blancos celulares periféricos de estos neuropéptidos son las células endoteliales y el músculo liso vascular, así como células del sistema inmune. En las células endoteliales vasculares y del músculo liso, el CGRP produce efectos vasodilatadores

mientras que la SP aumenta la permeabilidad capilar favoreciendo la extravasación plasmática y la formación de edema (Figura 7) (73, 74). Por otro lado, los neuropéptidos también pueden atraer y activar a las células del sistema inmune innato (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) y modular la respuesta del sistema inmune adaptativo como la activación de los linfocitos T (75). Lo anterior a través de su receptor específico ubicado en dichas células y que da como resultado un incremento de la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y quimiocinas (motivo CXC) ligando 1 y 5 (CXCL1 y 5). La activación de las cascadas de señalización asociadas resulta en una respuesta inflamatoria caracterizada por eritema, calor, edema e hipersensibilidad al dolor (76). Además, muchas de las sustancias liberadas por las células inmunes, como la histamina y TNF- α , son capaces de sensibilizar otras terminales nociceptivas cercanas, como las fibras A δ , lo que resulta en la amplificación del campo receptivo. Estos procesos celulares crean un ciclo de activación continua que mantiene la sensibilización de los nociceptores y una activación constante de las células del sistema inmune. Este fenómeno desempeña un papel importante en la alteración de la respuesta a estímulos térmicos, pero no en la sensibilización mecánica (54).

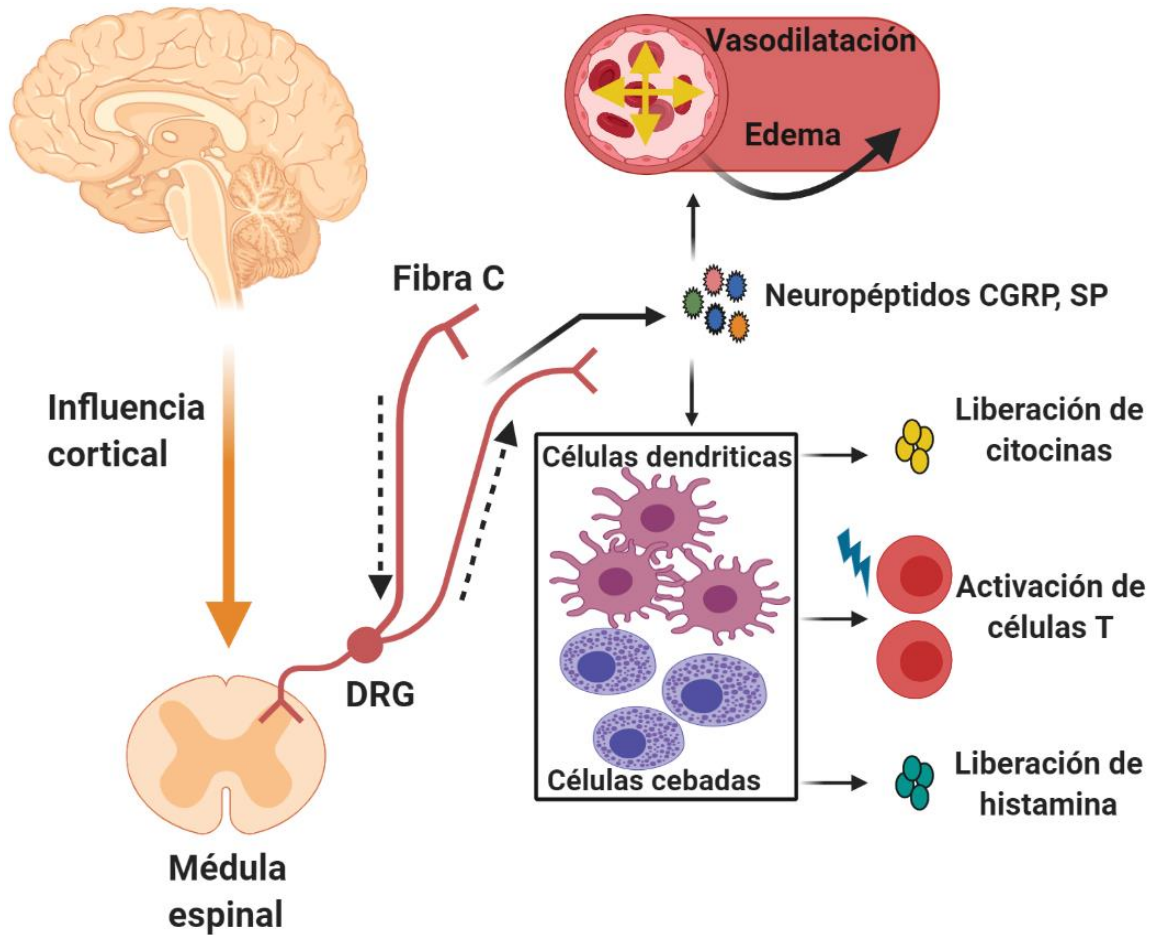


Figura 7. Inflamación neurogénica. La liberación de neuropéptidos como SP y CGRP por las terminales de las fibras C nociceptivas, transmiten la información a nivel de la asta dorsal de la médula espinal, donde hacen sinapsis con neuronas de segundo orden. Estas interacciones son moduladas por la influencia ejercida desde centros corticales. Por lo tanto, los neuropéptidos pueden actuar en los vasos sanguíneos y células del sistema inmune dando como resultados la liberación de citocinas e histamina, así como la activación de linfocitos T que contribuyen el mantenimiento de la sensibilidad al dolor y la respuesta inflamatoria. Modificado de Littlejohn., 2015⁽⁵⁴⁾.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1. Dolor crónico y sistema inmune

En los últimos años se ha destacado la importancia del sistema inmune en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico presente en diversas condiciones patológicas, debido a su capacidad de identificar y responder de forma selectiva a señales de daño que conllevan a la activación de una respuesta inmunológica (53, 77, 78).

La interrelación que existe entre el sistema inmunológico y el sistema nociceptivo en condiciones fisiológicas es indispensable para la supervivencia del organismo, dado que cada sistema puede modular la función del otro. Las células inmunes y las neuronas nociceptivas periféricas y centrales, son los principales sensores del entorno intracelular y extracelular dada su alta capacidad para identificar de manera muy eficaz y con alta especificidad moléculas pertenecientes a microorganismos exógenos o células moribundas. Por lo tanto, las células del sistema inmune y en menor medida, las neuronas nociceptivas pueden censar las señales de peligro a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR's, *por sus siglas en ingles*). Estos PRR's reconocen dos clases de moléculas, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's, *por sus siglas en ingles*), y los patrones moleculares asociados al daño (DAMP's, *por sus siglas en inglés*) también conocidos como alarminas. Las alarminas son componentes celulares o proteínas que se liberan cuando se produce lesión tisular, muerte celular o necrosis. La activación de los nociceptores puede ser directamente por la estimulación con DAMP's y PAMP's o indirectamente a través de la liberación de mediadores proinflamatorios (IFM) lo que resulta en la activación de células del sistema inmune y nervioso (Figura 8).

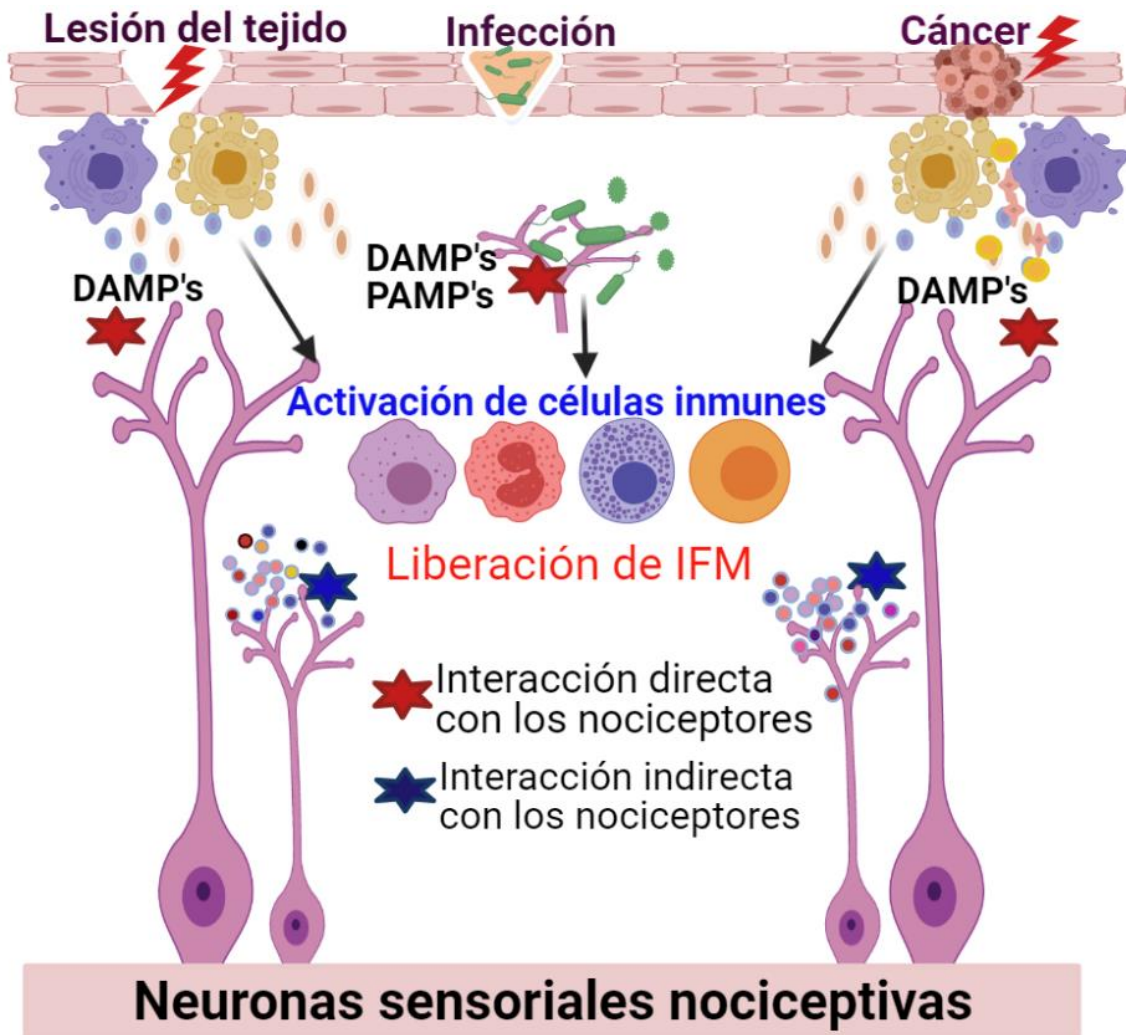


Figura 8. Detección de señales de daño por las células inmunes y los nociceptores, e interacción neuroinmune. La lesión del tejido sin daño a la barrera epitelial conduce a la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP's) por parte de las células del tejido. Mientras que la ruptura de la barrera epitelial puede dar paso a la entrada de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) tanto bacterianos como virales. Las células inmunes reconocen estas señales de daño mediante la activación de los receptores de reconocimientos de patrones (PRR's). Esto lleva a la producción y liberación de mediadores inflamatorios (IFM) como citocinas y quimiocinas que interactúan en las terminales de los nociceptores. Además, existen interacciones indirectas bien establecidas con los nociceptores a través de las células inmunes denominadas interacción neuroinmune (indicada con la estrella azul). Además, la evidencia sugiere que existe una interacción directa de las terminales de los nociceptores con los DAMP's y PAMP's (estrellas rojas). La activación de los nociceptores directa o indirecta da como resultados la generación de dolor. Modificado de Donnelly *et al.*, 2020⁽⁵³⁾.

La participación del sistema inmunológico en las condiciones de dolor crónico ocurre a través de diversas vías, por ejemplo; la liberación de autoanticuerpos como en el caso de la artritis reumatoide; o bien por medio de citocinas, quimiocinas o mediadores inflamatorios liberados de células del sistema inmune activas como en el caso de una lesión tisular (78).

Las células del sistema inmune tienen la capacidad de migrar a sitios relevantes en el procesamiento del dolor, por ejemplo, los ganglios de la raíz dorsal, el ganglio del trigémino y el asta dorsal de la médula espinal, en donde participan en el inicio, mantenimiento y cronicidad de diferentes tipos de dolor esto sin omitir su papel en la resolución del dolor agudo (Figura 9) (79-82).

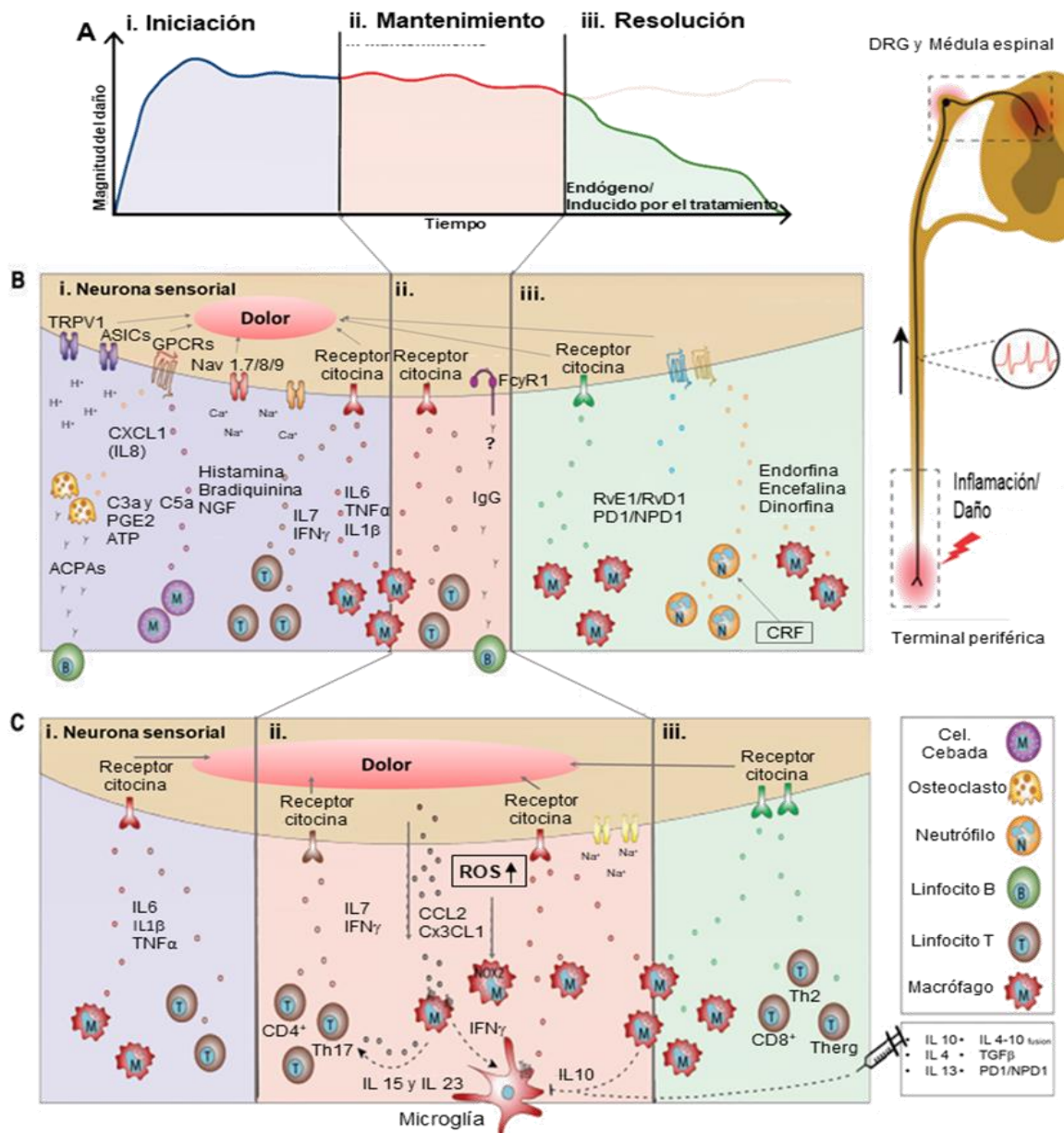


Figura 9. Participación de las células del sistema inmune y sus mediadores en diferentes estadios del dolor. A. Curso temporal del dolor crónico inducido por lesión o inflamación en donde se visualizan las diferentes etapas del dolor: (i) iniciación, (ii) mantenimiento y (iii) resolución. B y C, son representaciones esquemáticas de la participación de los diferentes tipos de células inmunes y mediadores durante las diferentes etapas del dolor. Durante la inflamación o el daño tisular, las células residentes e inmunitarias reclutadas en

el sitio dañado secretan mediadores inflamatorios que actúan sobre los nervios sensoriales periféricos que inervan el tejido afectado B. De forma similar, diferentes células inmunes migran a la médula espinal y/o los ganglios de la raíz dorsal para modular la sensibilidad durante las diferentes fases del dolor mediante la activación de diversos receptores y canales iónicos que participan en la transducción del dolor. ACPA: anticuerpo antiproteína citrulinada; ASIC: canal iónico sensibles a ácido; ATP: trifosfato de adenosina; CCL2: quimiocina (motivo CC) ligando 2; CRF: factor liberador de corticotropina; CX3CL1: quimiocina (motivo C-X3-C) ligando 1; Fcγ1: receptor Fcγ tipo 1; GPCR: receptor acoplado a proteína G; NGF: factor de crecimiento neural; PD1/NPD1: protectina D1/neuroprotectina D1; ROS: especies reactivas de oxígeno. Modificado de Raouf *et al.*, 2018⁽⁸⁰⁾.

La capacidad de reconocimiento del sistema inmune de una amplia variedad de patrones moleculares endógenos y exógenos con potencial nocivo es indispensable para la supervivencia del organismo (83). Por ejemplo los PRRs pueden detectar, PAMP's como los carbohidratos bacterianos, los lipopolisacáridos; ácidos nucleicos bacteriano y virales; peptidoglicano que procede de bacterias Gram positivas; formilmetionina y lipoproteínas (80).

2.1.1. Receptores de reconocimiento de patrones

Los PRRs incluyen a una amplia lista de receptores entre los que se encuentra la familia de receptores tipo Toll (TLR), el receptor tipo NOD (NLR), el receptor tipo RIG-1 y los receptores de lectina tipo C (CLR) (84). Estos se expresan abundantemente en las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos, aunque se encuentran en prácticamente todos los tipos de células del organismo. Estos receptores se localizan de forma estratégica en diferentes compartimentos celulares como: a) en las membranas celulares, donde median el reconocimiento de patógenos extracelulares (bacterias, virus y hongos), b) en los endosomas celulares donde detectan patógenos intracelulares como virus y bacterias, y c) en el citoplasma (85). Los PRRs, a diferencia de los receptores de la inmunidad innata tienen tres características principales: 1) que se expresan de manera universal, 2) producen una respuesta rápida y 3) con capacidad de reconocer una gran variedad de ligandos (86).

La activación de los PRR activa cascadas de señalización que dirigen la respuesta defensiva del huésped con el fin de destruir al patógeno y lo que culmina en una extensa reprogramación transcripcional de células que incluye la regulación de PRRs adicionales, la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas e interferones de tipo I que orquestan la respuesta inflamatoria y modulan la respuesta de la inmunidad adaptativa

posterior (80). Por ejemplo, la activación de las células presentadoras de antígenos es necesaria para activar a los linfocitos T y generar la respuesta de inmunidad específica (86).

Tras una lesión por quemadura o presión mecánica, se liberan moléculas intracelulares que inducen la activación y reclutamiento de células del sistema inmune (87). Estas señales de daño endógeno son llamadas DAMP's o alarminas. Los DAMP's son muy diversos desde el punto de vista estructural e incluyen moléculas como las proteínas de choque térmico (HSP), la proteína de alta movilidad de caja 1 (HMGB1), histonas y citocinas, a su vez algunas moléculas no proteicas también pueden actuar como señales de peligro, como el ADN o ARN, ADN mitocondrial y, moléculas pequeñas como ATP por mencionar algunos ejemplos (88).

En años recientes, se ha descrito la capacidad que poseen los nociceptores para interactuar con PAMP's y DAMP's a través de mecanismos directos e indirectos que implica la generación de respuestas nociceptivas en condiciones de dolor tanto agudo como crónico (53). Actualmente se reconoce que HMGB1 es un neuromodulador que media la interacción neuroinmune por lo que alteraciones en la función de HMGB1 están asociada a muchas patologías especialmente con las que cursan con un estado inflamatorio así como con una amplia variedad de enfermedades que cursan con dolor crónico (89).

2.2. HMGB1: estructura y función

La alarmina HMGB1 es una proteína del grupo de alta movilidad de caja 1 (HMGB1), que pertenece a la superfamilia de proteínas de alta movilidad junto con las histonas. Su alta movilidad electroforética es la característica que en su descubrimiento le dio el nombre de anfoterina. HMGB1 es codificada por el gen *hmgb1* y fue el primer miembro identificado de la familia HMGB que está integrada por HMGB1, HMGB2 y HMGB3 (90). Evolutivamente, es una proteína altamente conservada y presenta un grado de homología del 99% en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas de humano y roedor. HMGB1 se expresa de forma abundante en todos los tipos celulares, por lo que desempeña un papel crítico en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos (90). Además, tiene la capacidad de viajar del núcleo al citoplasma, y desde el citoplasma puede ser movilizad a mitocondrias y al espacio extracelular (91).

Estructuralmente HMGB1 es una proteína de 215 aminoácidos con peso molecular de 30 kDa (Figura 11A). Está constituida por tres dominios: la caja A (aá, 9 – 79), la caja B (aá 95 – 163) y una cola ácida en el extremo C terminal (aá186 – 215) que está conformada por aproximadamente 30 residuos continuos de ácido glutámico y ácido aspártico lo que le confiere carga negativa (92).

La alarmina HMGB1 posee funciones específicas que dependen de 1) su localización en la célula, 2) la formación de complejos de unión con algunos PAMP's y DAMP's, y 3) el estado redox de cada uno de sus tres residuos de cisteína (C23, C45 y C106) que son sensibles a modificaciones de tipo óxido-reducción (redox) dependiente del microambiente celular lo que le confiere especificidad para unirse a receptores específicos de superficie (93).

Las cajas A y B actúan como dominios de unión al ADN y están formadas por dos α -hélices, una corta y una larga que al plegarse producen una estructura tridimensional en forma de L. HMGB1 presenta dos secuencias de localización nuclear (NLS), cada una ubicada en la caja A (aá, 27 - 43) y en la caja B (aá, 178 - 186) lo que permite que la HMGB1 recién sintetizada se mantenga en el núcleo (93). Sin embargo, una fracción de la HMGB1 se exporta constantemente al citoplasma, debido a que NLS1 y NLS2 presentan cuatro y cinco residuos de lisina altamente conservados y susceptibles a modificaciones por acetilación. La acetilación favorece la movilización de HMGB1 desde el núcleo al citoplasma (Figura 11A). Estudios de estructura-función han mostrado que la caja A actúa como un antagonista de HMGB1 mientras que la caja B posee actividad de citocina (94).

HMGB1 presenta secuencias de aá que permiten unión específica a diferentes receptores expresados en la superficie celular y cuya activación desencadena una respuesta inflamatoria. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos 89-108 permite que HMGB1 se una al receptor TLR-4 e inicie la transcripción de genes que culmina en la síntesis de citocinas proinflamatorias. La secuencia de aminoácidos 23-50 y 150-183, le permiten el reconocimiento y la unión al receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE), mientras que la secuencia de aminoácidos 185-205 presente en la cola ácida es reconocida por el receptor TLR-5 que se expresa en células neuronales (93, 95).

Según la localización de HMGB1 en los diferentes compartimentos celulares, la proteína desempeña funciones biológicas específicas (Figura 11B-E). En el núcleo, actúa como una chaperona del ADN, al unirse de manera transitoria a secuencias del ADN específicas, a través de las cajas A y B, esta interacción favorece la curvatura reversible del ADN. Además, participa en la regulación de la homeostasis nuclear y estabilidad del genoma de varias formas, por ejemplo, en la arquitectura de la cromatina, sostiene la dinámica del nucleosoma, da estabilidad a los cromosomas, modula la transcripción de genes, participa en la reparación del ADN, la recombinación genética, el mantenimiento de los telómeros y facilita la unión a factores de transcripción (90). La traslocación de HMGB1 al citoplasma, le permite interactuar con proteínas del complejo Beclin1-BCL2 para liberar Beclin1 y de esta forma inducir o incrementar el proceso de autofagia. A nivel de la membrana, contribuye a la activación plaquetaria mientras que en neuronas contribuye al crecimiento de neuritas durante el desarrollo y la regeneración nerviosa (92, 96). Como ya se ha mencionado a nivel extracelular la HMGB1 actúa como citocina, induciendo el reclutamiento y activación de células cebadas, macrófagos y otras células productoras mediadores inflamatorios con la finalidad de modular, regular y reparar las células dañadas (88).

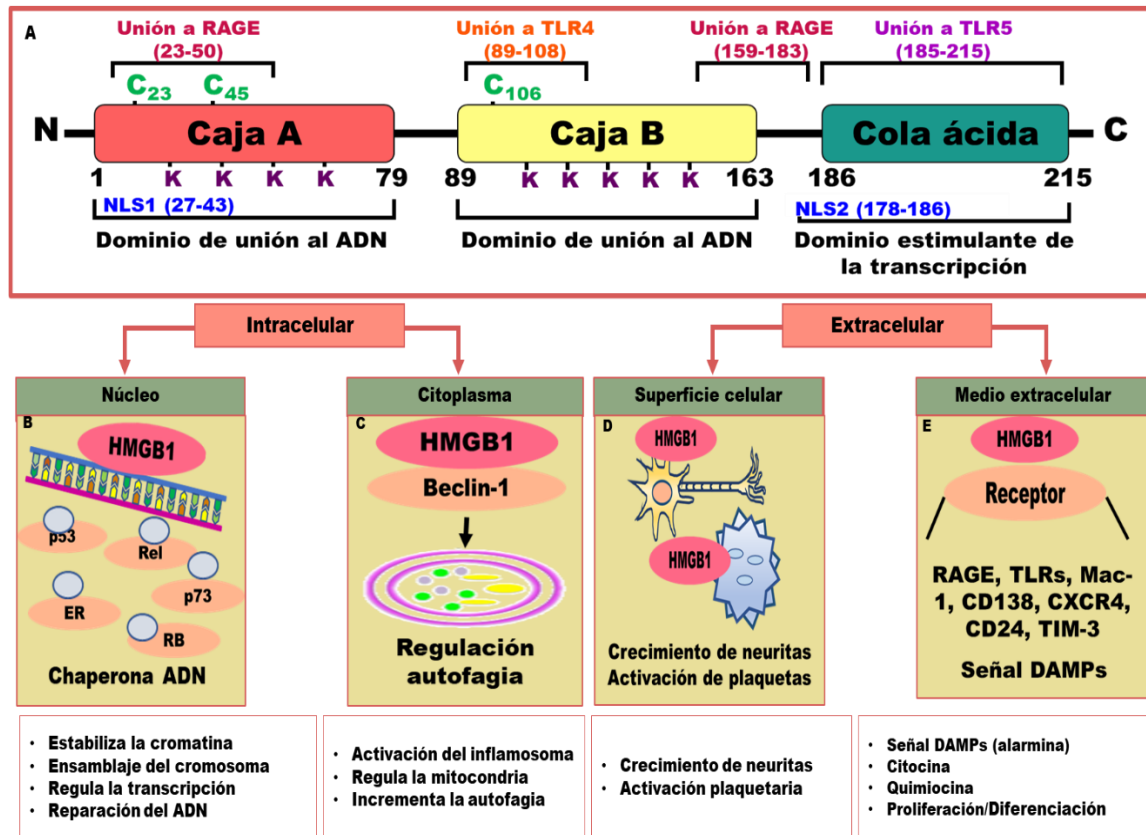


Figura 10. Estructura y función de la proteína HMGB1. A) HMGB1 está formada por los dominios caja A, caja B y una cola ácida, B) HMGB1 en el núcleo cumple función de chaperona del ADN, así mismo participa y mejora las funciones de varios factores de transcripción, C) cuando HMGB1 es localizado en el citoplasma se une a beclin-1 para regular a autofagia. D) a nivel de membrana HMGB1 promueve el crecimiento de neuritas y la activación de plaquetas E) en el medio extracelular HMGB1 se une a una amplia variedad de receptores y actuar como una DAMP's para iniciar respuesta inmune. Modificado de Chen *et al.*, 2013⁽⁹⁷⁾.

2.2.1. Liberación y estados redox de HMGB1

La liberación extracelular de HMGB1 de las células del sistema inmune como; macrófagos, microglía, neutrófilos así como de células no inmunes como; fibroblastos, células epiteliales, neuronas, plaquetas, hepatocitos y cardiomiocitos se lleva a cabo a través de dos vías diferentes, a) liberación pasiva y b) secreción activa (98).

La liberación pasiva se produce casi de manera instantánea después de la muerte celular, en donde el tipo de muerte es crucial ya que influye de manera importante en el estado redox de HMGB1, lo que impacta en su función biológica. La HMGB1 que se libera de forma inmediata al espacio extracelular se encuentra en su estado tiol (HMGB1_{SH2}) isoforma a la que también se le denomina _{at}HMGB1 o _{all}HMGB1, pero su exposición a un

ambiente altamente oxidante induce que los residuos de cisteína de la caja A (C23 y C45) forman un puente disulfuro (HMGB1_{S-S}) dando lugar al estado disulfuro que se denomina _{ds}HMGB1, tanto el estado tiol como el disulfuro son isoformas reversibles de la proteína. Mientras que la sulfonación de los residuos de cisteínas da origen a una isoforma completamente oxidada que es irreversible (HMGB1_{so3-}) también conocida como _{ox}HMGB1 (93).

Cuando se produce muerte celular por necrosis se libera HMGB1 completamente reducida (all-HMGB1). En este estado redox, actúa como factor quimiotáctico con una vida media de 30 minutos, mientras que cuando la muerte celular es por apoptosis la mayor parte de HMGB1 es retenido en cuerpos apoptóticos y está fuertemente unida al ADN oxidado (_{ox}-HMGB1). Sin embargo, si el aclaramiento fagocítico de los desechos apoptóticos no se realiza adecuadamente se produce necrosis secundaria con liberación baja de bajas concentraciones de HMGB_{SH2}, y mayor liberación de HMGB1_{so3⁻} (93). La liberación de HMGB1 hiperacetilado, en estado disulfuro y completamente oxidado puede llevarse por dos vías; por la activación del inflamosoma, que lleva a la aparición de piroptosis, o por la necrosis programada, también conocida como necroptosis (99).

La secreción activa de HMGB1 puede ser inducida por patógenos microbianos o sustancias endógenas como ROS, Especies Reactivas de Nitrógenos (RNS), las citocinas inflamatorias TNF- α , interferón- α , interferón- γ , así como ATP, óxido nítrico o por interacciones célula-célula. La secreción activa es un proceso lento debido a que la HMGB1 ubicada en el núcleo es regulada por el proceso de acetilación que induce su acumulación en el citoplasma, esto en respuesta a la activación de diferentes vías de señalización, tales como JAK/STAT1, cinasa de calmodulina dependiente de calcio²⁺ (CAMK), así como de la histona acetiltransferasa y la proteína de unión a CREB (CBP)/p300, que es responsable de la acetilación de HMGB1 (98, 100). La HMGB1 en sus estado hiperacetilado se acumula en el citoplasma en lisosomas secretores para ser liberada al espacio extracelular (Figura 11) (90, 93, 101).

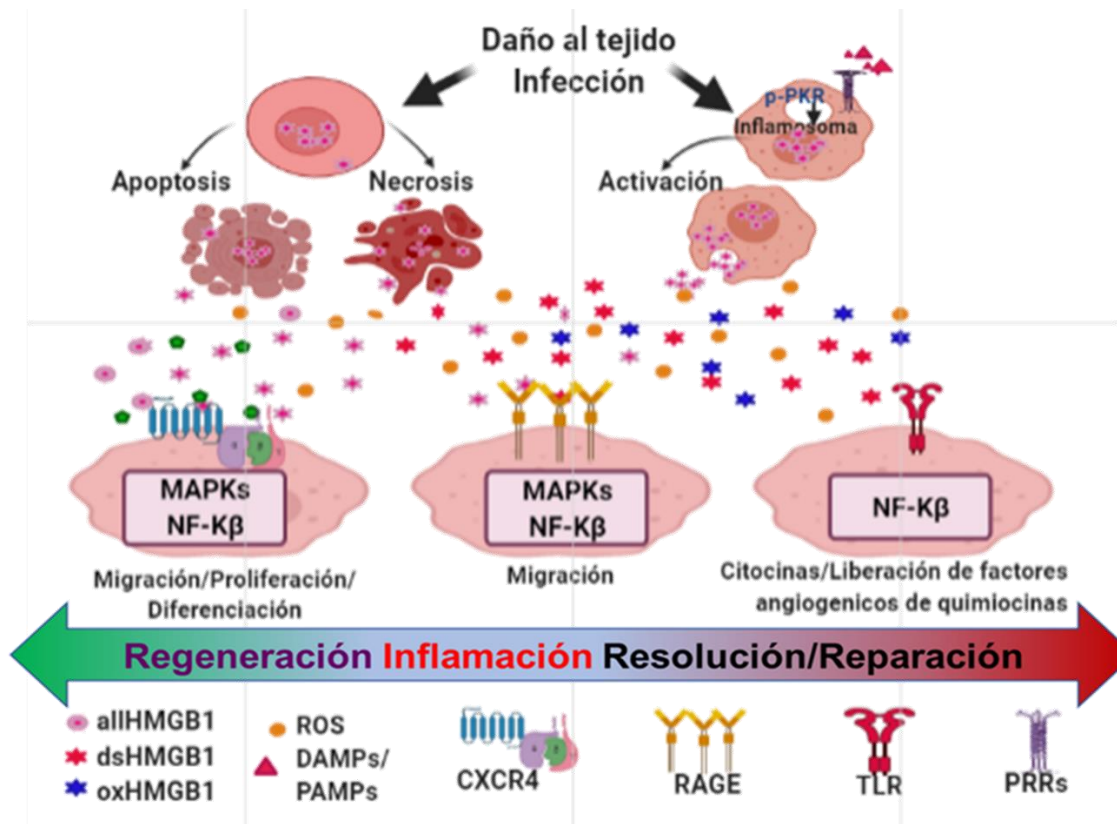


Figura 11. Liberación de HMGB1, estados redox y respuesta celular. La liberación de HMGB1 a partir de las células del sistema inmune puede ser pasiva o activa, en donde las funciones de HMGB1 dependen del estado de óxido-reducción de sus residuos de cisteínas (C23, C45 y C106). El estado redox le confiere a HMGB1 afinidad por PRRs específicos como TLR, o RAGE que participan en diferentes funciones celulares. all-HMGB1: HMGB1_{SH2}, ds-HMGB1: HMGB1 estado disulfuro (s-s), ox-HMGB1: HMGB1 todo oxidado (SO₃), ROS: especies reactivas de oxígeno, DAMP's: patrones moleculares asociados a daño, PAMP's patrones moleculares asociados a patógenos, CXCR4: receptor de quimiocina ligando 4, RAGE: receptor de productos finales de glicosilación avanzada, TLR: receptor tipo Toll, PRRs: receptores de reconocimiento a patrones. Modificada de Raucchi *et al.*, 2019⁽¹⁰²⁾.

2.2.2. Receptores de HMGB1

La lista de receptores de membrana a través de los cuales HMGB1 puede ejercer sus acciones extracelulares es extensa y a la fecha se han reportado por lo menos 14 diferentes receptores que incluyen a; RAGE, TLR (TLR-1, -2, -4, -5, -7 y -9), CD24, receptor NMDA, TIM-3, haptoglobina y CXCR4 (103). La interacción de HMGB1 con un tipo de receptor u otro depende de su grado de óxido-reducción y la formación de heterocomplejos con otros DAMP's o PAMP's. Por ejemplo, la isoforma all-HMGB1 se une al receptor RAGE, mientras que la isoforma ds-HMGB1 se une a TLR-4. Por otro lado, la formación de heterocomplejos con otras moléculas solubles como CXCL12 (CXCL12-all-HMGB1) permiten la unión a CXCR4. La activación de estos receptores activa cascadas de

señalización que llevan a la activación de NF- κ B y culmina en la transcripción de genes proinflamatorios (93, 104). A continuación se describen las vías de señalización de los receptores que son relevantes para este trabajo y que han sido ampliamente descritas en muchas condiciones de dolor patológico (Figura 12) (98, 105).

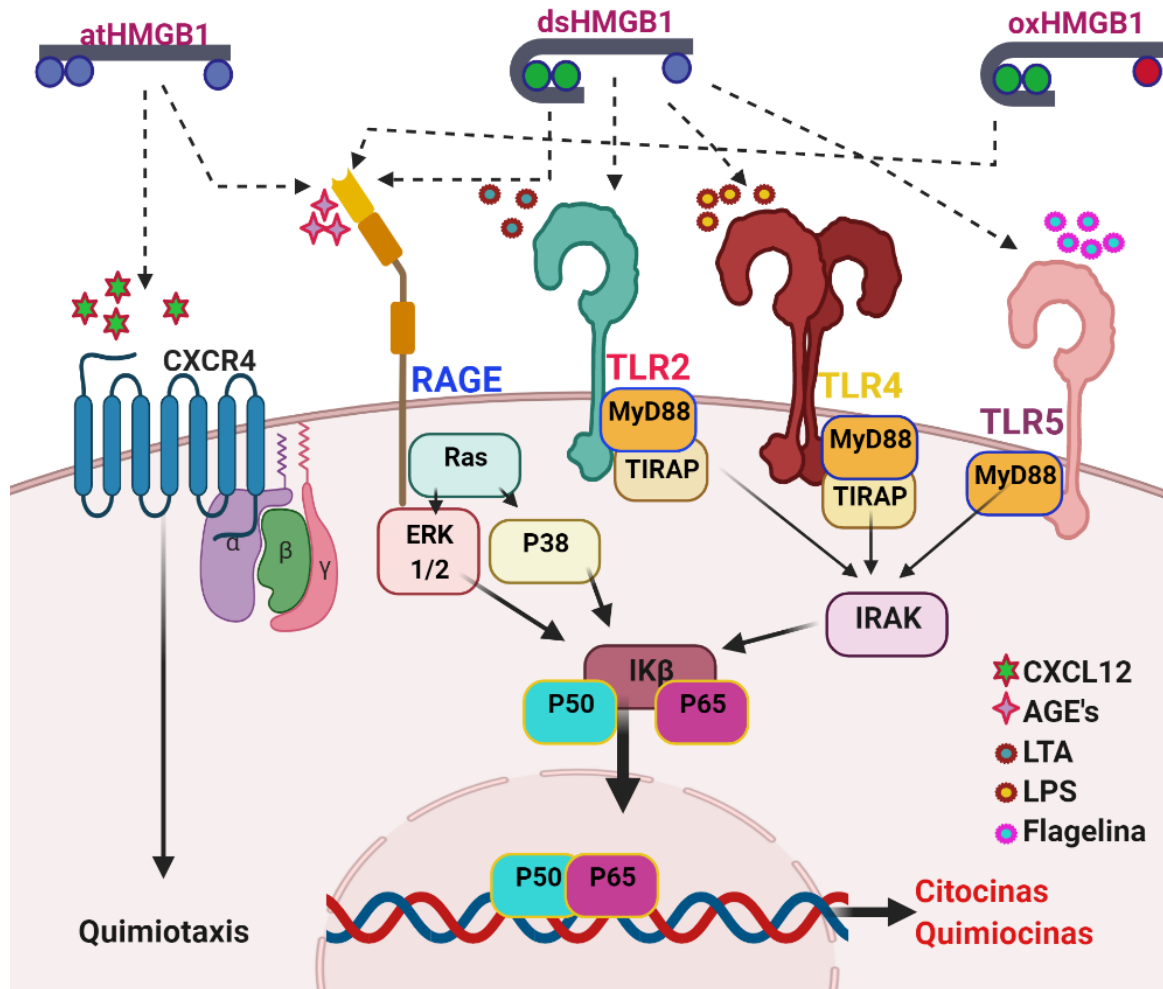


Figura 12. Vías de transducción de señales asociadas con HMGB1. La interacción de HMGB1 con CXCR4, RAGE, TLR-2, TLR-4 y TLR-5, activan cascadas de transducción de señales intracelulares a través de una vía común que conduce a la activación de NF- κ B. La interacción de HMGB1 con LPS, LTA y flagelina mejora la señalización mediada por los receptores TLR -2, -4, y -5 respectivamente, lo que conduce a la activación de NF- κ B y la producción de citocinas proinflamatorias. El NF- κ B activado que se libera de I κ B se transloca al núcleo y se une al ADN, produciendo la formación del heterodímero p65/p50 y posteriormente inicia la transcripción de citocinas y quimiocinas. Por otro lado, HMGB1 también interactúa con CXCL12, que se une a CXCR4 e induce la quimiotaxis y reclutamiento de células inflamatorias. I κ B: inhibidor kappa beta; LPS, lipopolisacárido; LTA, ácido lipoteicoico; TIRAP: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR; MyD88, diferenciación mieloide 88; IRAK, cinasa asociada a receptor de interleucina-1. Modificada de Lee. *et al.*, 2014⁽¹⁰⁴⁾.

2.2.3.1. Receptor RAGE

El receptor RAGE es un receptor transmembranal que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Es una proteína de 45 kDa que posee dominio de tipo V que permite la unión con el ligando, y dos dominios de tipo C además presentar una hélice giratoria transmembrana y un extremo terminal con dominio citosólico, necesario para la transducción de señales (ctRAGE) (98).

Este receptor se expresa ampliamente en diversos tipos celulares que incluyen células inmunes como macrófagos, neutrófilos y células cebadas, así como en células endoteliales y neuronas aferentes primarias, en células gliales satélites del ganglio de la raíz dorsal y en células de Schwann de los nervios espinales (106).

El receptor RAGE reconoce una amplia gama de ligandos endógenos como por ejemplo los productos finales de glicosilación avanzada (AGE), HMGB1, péptido β -amiloide ($A\beta$) y S100 (107). La unión de HMGB1 a RAGE da inicio a una cascada de señalización intracelular que incluye la activación de las vías de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y NF- $\kappa\beta$ (108, 109).

Estudios científicos muestran que HMGB1 requiere de RAGE para generar una respuesta inflamatoria, que incluye dolor, migración celular, neurogénesis, autofagia y proliferación celular (103). Además se ha demostrado que la administración de α HMGB1 a nivel periférico puede inducir alodinia e hiperalgesia a través de RAGE, lo que resalta su importancia en la contribución de condiciones de dolor neuropático inducido por lesión nerviosa y dolor visceral que acompaña a la cistitis (89, 110).

2.2.3.2. Receptores TLR

Los TLR son una superfamilia de receptores transmembranales de tipo I altamente conservados evolutivamente. Estos receptores poseen entre 19 y 25 dominios ricos en repeticiones de leucina en su dominio extracelular, una región transmembranal y una porción intracelular citoplasmática con dominio TIR (Toll/receptor de IL-1). En ratones se han descrito 13 isoformas, mientras que en humanos solo se han descubierto 10 miembros que incluyen a receptores de superficie (TLR -2, -4, -5, -6 y -10) y receptores de membrana endosomales (TLR -3, -7, -8 y -9). La expresión celular de estos receptores es extensa

encontrándose tanto en células inmunes como células dendríticas y macrófagos, así como en células no inmunes, como fibroblastos, células epiteliales, células gliales y neuronales (111). Los TLR -2, -3, -4, -5, -7 y -9 son expresados en neuronas nociceptivas, mientras que los TLR -2 y -4 se expresan de forma específica la microglía y astrocitos. La activación de estos receptores en las células neuronales induce la liberación de una gran cantidad de mediadores proinflamatorios independiente pero similar a la producida por el sistema inmune (111). De forma específica TLR-4 se expresa ampliamente en el sistema nervioso en células como la microglía, astrocitos y neuronas sensoriales sensibles a capsaicina, así como en neuronas nociceptivas del ganglio del trigémino y el ganglio de la raíz dorsal (112). Además, TLR-4 co-expresa junto con TRPV1, así como P2X2 (98, 113).

La activación de los receptores TLR a excepción de TLR-3 (Figura 13) requieren del reclutamiento de MyD88. Mientras que los receptores TLR -1, -2, -4 y -6 reclutan a la proteína adaptadora de diferenciación 14 (CD14) así como a la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP) que se une al extremo C-terminal intracelular del dominio conformado por el receptor tipo Toll y el receptor de interleucina-1 (TIR) con dominio MyD88. En la ruta de señalización dependiente de MyD88, se recluta la cinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK), que interactúa con la proteína adaptadora asociada al receptor de factor de necrosis tumoral 6 (TRAF6) lo que proporciona un enlace al NF- κ B. Esta misma ruta de MyD88 facilita la expresión de las proteínas MAPK y los factores de transcripción, como el factor regulador de interferón (IRF) que impulsa transcripción de genes inflamatorios (114).

La activación de TLR-4 puede ser dependientes de MyD88 o del dominio TIR dependiente de interferón β (TRIF) lo que requiere de la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) para poder asociarse con TRIF y continuar la vía de señalización río abajo hasta iniciar la transcripción de genes mediada por las MAPK o NF- κ B (115).

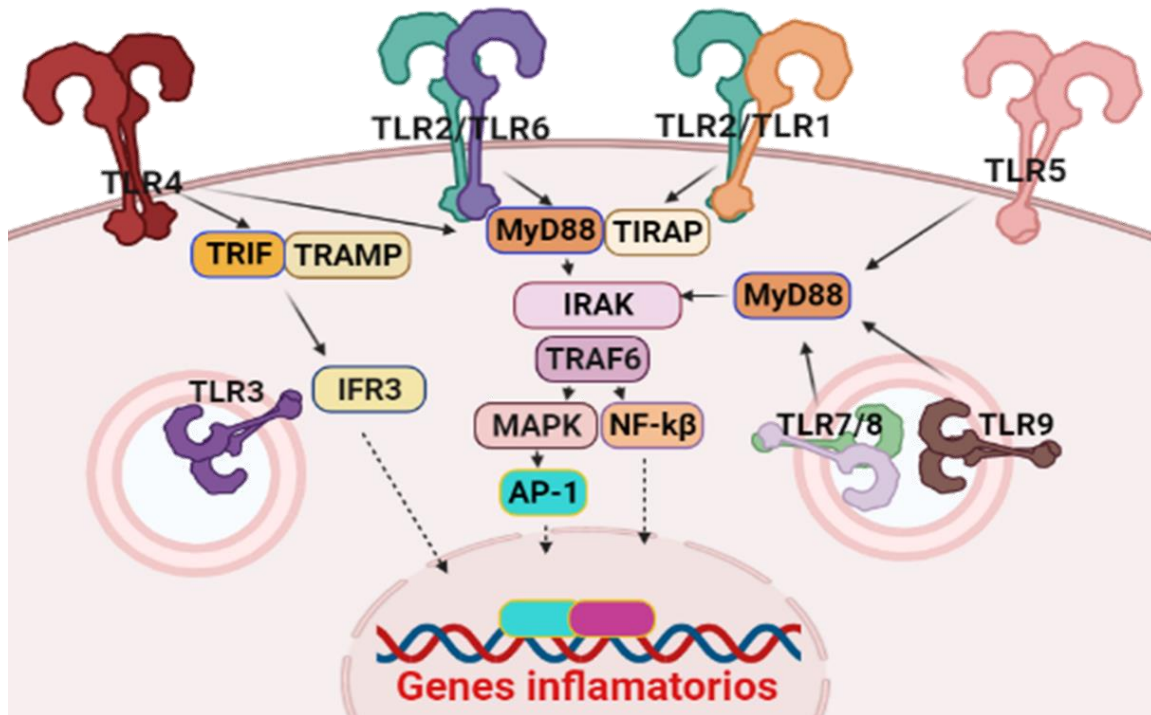


Figura 13. Vías de señalización de los receptores TLR. La activación de los diferentes receptores requiere de proteínas adaptadoras para iniciar las diferentes vías de señalización que culminan en la transcripción de genes inflamatorios como citocinas y quimiocinas. AP-1: proteína adaptadora 1; TIRAP: proteína adaptadora con dominio del receptor Toll-interleucina 1, TIR: Toll/ receptor interleucina 1, MyD88: Diferencial mieloides 88, IRAK: cinasa asociada al receptor de interleucina-1, TRAF: factor asociado a receptor del factor de necrosis tumoral 6, NF-k β : factor nuclear kappa β ; IRF: factor regulador de interferón, TRIF: interferón beta inductor del adaptador que contiene el dominio TIR, TRAM: molécula adaptadora relacionada con TRIF. Modificado de Goulopoulou, *et al.*, 2016⁽¹¹⁴⁾.

La transcripción de genes está mediada por la activación de MAPK y NF-k β que inducen la transcripción de genes para la síntesis de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8. Mientras que la activación independiente de IRF es necesaria para la producción de interferón tipo 1 (116).

Los receptores TLR-2, TLR-4 y TLR-5, han sido relacionados extensamente como receptores cruciales en la señalización del dolor por ser importantes mediadores en procesos inflamatorios a corto y largo plazo, al inducir la transcripción de genes dirigidos por NF-k β a través de la vía MyD88 y la vía de TRIF (95, 117, 118).

La interacción de HMGB1 con algunos TLR incluyen a TLR -1, -2, -4, -5, -7 y -9 particularmente. Los ligandos inicialmente descritos para el receptor TLR-2 son los lipopéptidos, para TLR-4 son los lipopolisacáridos y para TLR-5 la flagelina, no obstante

estos receptores están asociados al desarrollo y/o agravamiento de las señales inflamatorias y de dolor (119, 120).

La interacción TLR-4 con HMGB1 depende del correceptor CD14 que se expresa en macrófagos y en células de la glía (astrocitos, microglía) lo que resulta en la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios (121). La activación de la microglía libera una amplia gama de mediadores proinflamatorios que pueden exacerbar el daño tisular y estimular el reclutamiento de células inmunes periféricas al sitio de la lesión (122). Siendo el ligando principal de TLR-4 el LPS, estructura importante de la membrana de bacterias gramnegativas, cuyo reconocimiento activa respuesta inflamatoria (123) este receptor también reconoce ligandos endógenos como fibronectina, HMGB1, HSP de 60 y 70 kDa, entre otras moléculas (124).

El principal ligando del receptor TLR-5 es la flagelina, proteína constitutiva de los flagelos bacterianos. El TLR-5 es un receptor importante por su participación en desarrollo de condiciones patológicas puesto que su activación inicia respuesta inmune innata. En el DRG se ha identificado que este receptor se coexpresa en el 91% de neuronas que expresan con el neurofilamento 200 (NF-200), que es un marcador de neuronas de diámetro grande tipo A, en el 7.2% de las neuronas de diámetro pequeño que expresan CGRP un marcador de neuronas peptidérgicas y fibras A δ , así como en el 7.7% de las neuronas que expresan tirosina hidroxilasa (TH) un marcador de fibras C de bajo umbral, pero solo un 0.5% de las neuronas se unen a isolectina B4 (IB4) un marcador de fibras C no peptidérgicas. Así también se identificó ARNm de TLR-5 en fibras nerviosas de la piel y terminales axonales de láminas profundas del asta posterior de la médula espinal de ratones (120).

2.3. Participación de HMGB1 en el dolor

2.3.1. HMGB1 en el dolor agudo

La alarmina HMGB1 es una importante molécula intracelular con funciones bien establecidas, no obstante, su sobreexpresión y/o liberación al medio extracelular se ha observado en muchas condiciones patológicas. Esto ha dirigido las investigaciones de HMGB1 a campos no tan explorados y con impacto significativo en la salud como lo es el dolor. La participación de HMGB1 en el dolor agudo ha sido evidenciada a través del uso

de pruebas *in vitro* y modelos *in vivo*, el uso de herramientas farmacológicas de molécula pequeña, anticuerpos (Ab) anti-HMGB1 o pequeños RNA de interferencia, y con la ayuda de diversas técnicas de moleculares. Con todas estas herramientas se ha demostrado que HMGB1 desempeña un papel pronociceptivo en el dolor agudo. En este sentido existen estudios que mostraron que la administración exógena de HMGB1 a diferentes niveles de la vía nociceptiva produce hipersensibilidad al dolor. Así por ejemplo a nivel del nervio ciático de rata o ratón produce neuritis inflamatoria que se manifiesta por alodinia mecánica unilateral cuando se administran dosis pequeñas (0.1-10 ng) o bilateral cuando se administran dosis mayores (3 µg, 0.1 mg). Otra manifestación frecuente de la neuritis es el desarrollo de hiperalgesia térmica. Estas manifestaciones de hipersensibilidad inician rápidamente después de la administración de HMGB1 y perduran hasta por 72 horas (125, 126). De igual forma, la administración intratecal de HMGB1 recombinante de bovino (1-1000 ng) produce alodinia mecánica de manera dependiente de la dosis que perdura por al menos 72 horas (127, 128). Además, se observó que la respuesta nociceptiva inducida por HMGB1 intratecal fue dependientes de la activación de la microglía y la liberación de IL-1β a través del receptor TLR-4 (127, 128). Por otro lado, cuando se administró HMGB1 por vía intraplantar en rata 10 y 20 µg/pata; (129, 130) o ratón (1-1000 ng/pata) (131, 132) se observó hipersensibilidad mecánica que se acompaña con una disminución de la latencia de respuesta a estímulos térmicos y edema de la pata que perduro por al menos 5 horas. La hiperalgesia mecánica inducida por HMGB1 intraplantar se atenuó con antagonistas de los receptores TLR-4, TLR-5 y RAGE (95, 129-132). Todos estos resultados en conjuntos sugieren que HMGB1 desempeña un papel importante en la transmisión del dolor tanto a nivel periférico como central. Además, dado que está bien documentado que la función de HMGB1 depende del estado de oxidación de sus residuos de cisteína C23, C45 y C106 (94), se ha explorado si sus efectos pronociceptivos dependen de su estado redox. Se encontró que de la misma forma que HMGB1 recombinante de bovino las isoformas $_{at}$ HMGB1 y $_{ds}$ HMGB1 producen hipersensibilidad al dolor, siendo la $_{ds}$ HMGB1 la más potente en producir conductas nociceptivas. Además, se observó que $_{at}$ HMGB1 y $_{ds}$ HMGB1 producen hiperalgesia a través de los receptores RAGE y TLR-4, respectivamente (131, 132).

Por otro lado, los efectos pronociceptivos de HMGB1 también se han explorado en modelos de dolor visceral como lo es el dolor causado por la cistitis. En estos modelos la cistitis se induce experimentalmente mediante la administración de ciclofosfamida o el péptido activador del receptor de proteasas 4 (PA-PAR4) en ratón. En el modelo de ciclofosfamida se ha observado que la administración de HMGB1 facilita el desarrollo de hiperalgesia referida. Además, el tratamiento con un Ab anti-HMGB1, trombomodulina o un antagonista de RAGE disminuyen las conductas nociceptivas inducidas por cistitis, lo que sugiere un papel importante de HMGB1 en este modelo de dolor (133). De forma similar, en el modelo de dolor de vejiga inducido por PA-PAR4 HMGB1 incrementó en el líquido vesical y disminuyó en un 41.7% los niveles uroteliales, mientras que la hipersensibilidad mecánica abdominal fue revertida por el tratamiento con el inhibidor de HMGB1 glicirricina (50 mg/kg) o un inhibidor de MIF lo que sugiere que el papel de HMGB1 en el dolor de vejiga inducido por PAR-4 depende de la migración de macrófagos (134).

En conjunto todos estos estudios respaldan el efecto pronociceptivo de HMGB1 ya sea que se administre de forma exógena o bien mediante su liberación intracelular causada por sustancias irritantes o lesión tisular que se asocia con la presencia de dolor.

Tabla 1. Participación de HMGB1 en el dolor agudo

Modelo de dolor/ (prueba conductual)	Tratamiento/técnicas moleculares	Resultados	Conclusiones	Ref.
Neuritis inflamatoria del nervio ciático en rata o ratón. (alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)	Administración pericrática de HMG o HMGB1 (0.1 ng a 0.1 mg/ 5 a 10 µL).	<ul style="list-style-type: none"> • HMG produjo alodinia mecánica e hiperalgesia térmica desde la hora 3 y perduro hasta 72 h. • La alodinia mecánica e hiperalgesia térmica dependiente fue dependientes de la dosis de HMGB1 y revertida por el Ab anti-HMGB1. 	<ul style="list-style-type: none"> • La administración local de HMGB1 a nivel del nervio ciático produce dolor. 	(106, 125, 126)
Hipersensibilidad al dolor inducida por HMGB1 intratecal en ratón. (Alodinia mecánica)	Tratamiento (i.t.). HMGB1 (1, 3, 5, 10 y 100 ng/5 µL). IN-C34 (1 y 10 nmol/5µL); GIT27 (50 y 100 nmol/5µL) y TAK 242 (5 nmol/5µL). TH1020 (1, 3 y 10 nmol/5µL). FPS-ZM1 (1 y 100 nmol). ADM3100 (2 y 3.5 nmol). IHC para HMGB1 en cél. gliales (+) Iba1. Fluorocitrato (100 pmol) y L-2AA (10 nmol).	<ul style="list-style-type: none"> • La HMGB1 (i.t.) produjo alodinia mecánica dependiente de la dosis y se mantuvo de 2 a 72 h post-inyección. • El efecto pronociceptivo inducido por HMGB1 (i.t.) fue revertido por los antagonistas de TLR-4, pero no por los antagonistas de TLR-5, RAGE o CXCR4. • La HMGB1 (i.t.) incrementó el inmunomarcaje de GFAP, el cual fue disminuido por el tratamiento con el antagonista del TLR-4. • El fluorocitrato o L-2AA (i.t.) disminuyó la alodinia inducida por HMGB1 (i.t.) a las 24 y 48 horas post-administración. 	<ul style="list-style-type: none"> • La administración de HMGB1 a nivel del SNC produce dolor. • El efecto pronociceptivo de HMGB1 a nivel espinal depende de la activación de la microglía, la liberación de IL-1β que está mediado por el receptor TLR-4. 	(127, 128)
Hipersensibilidad al dolor inducida por HMGB1 en rata. (Hiperalgesia mecánica y térmica, edema de la para).	HMGB1 (10 y 20 µg/pata). Ab anti-HMGB1 (1 mg/kg, i.p.). rhsTM (1–10 mg/kg, i.p.). LPS-RS (50 µg/i.pl.). LMWH (10 µg/i.pl.).	<ul style="list-style-type: none"> • La administración i.pl. de HMGB1 produjo hiperalgesia mecánica y edema de la pata que perduró por 5 horas. Además, disminuyó la latencia de respuesta a estímulos térmicos. • La hiperalgesia mecánica pero no el edema de la pata inducido por HMGB1 se revirtió por le pretratamiento con los antagonistas TLR-4 y RAGE 	<ul style="list-style-type: none"> • La HMGB1 i.pl. produjo hiperalgesia mecánica y térmica, así como edema de la pata. • El efecto pronociceptivo de HMGB1 depende de la activación TLR-4 y RAGE. 	(129, 130)

<p>Hipersensibilidad al dolor inducida por HMGB1 en ratón. (Alodinia mecánica)</p>	<p><u>Tratamiento:</u></p> <p>^{bt}HMGB1 (1-1000 ng/pata).</p> <p>^{at}HMGB1 (1-100 ng/pata).</p> <p>^{ds}HMGB1 (1-100 ng/pata).</p> <p>Ab anti-RAGE (100 ng/pata).</p> <p>Ab anti-HMGB1 (1 mg/kg, i.p.).</p> <p>HBPM (2.5 mg/kg, i.p.).</p> <p>LPS-RS (0.5 mg/kg, i.p.).</p> <p>Antagonista del receptor CXCR4 (5 mg/kg, i.p.).</p> <p>TMα o ART123 (05-50 μg, i.pl.).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • HMGB1 administrada por vía i.pl. produjo hiperalgesia mecánica de manera dependiente de la dosis y que perdura por al menos 5 horas. Este efecto fue revertido por la administración sistémica del Ab anti-HMGB1 y el inhibidor de RAGE, así como por el anticuerpo anti-RAGE, pero no por el antagonista TLR-4 o el antagonista CXCR4. • De la misma forma que ^{bt}HMGB1, ^{at}HMGB1 y ^{ds}HMGB1 producen hiperalgesia, siendo ^{ds}HMGB1 la más potente. • La hiperalgesia inducida por ^{at}HMGB1 fue revertida por el antagonista de RAGE, pero no por el de TLR-4. • La hiperalgesia inducida por ^{ds}HMGB1 fue revertida por el antagonista de TLR-4 pero no por el de RAGE. • TMα revirtió la alodinia mecánica inducida por ^{bt}HMGB1, ^{at}HMGB1 y ^{ds}HMGB1. 	<ul style="list-style-type: none"> • El efecto pronociceptivo de HMGB1 depende de su estado de oxidación. • ^{at}HMGB1 y ^{ds}HMGB1 producen hiperalgesia a través de los receptores RAGE y TLR-4, respectivamente • La alodinia inducida por ^{at}HMGB1 y ^{ds}HMGB1 es revertida por TMα. 	<p>(131, 132)</p>
<p>Alodinia mecánica inducida HMGB1 (i.pl.) en rata. (Alodinia mecánica).</p>	<p><u>Tratamiento (i.pl):</u></p> <p>HMGB1 (10 μl).</p> <p>TH1020 (0.3-1 μl).</p> <p><u>Técnicas:</u></p> <p>WB: células HEK-hTLR-5 con flagelina.</p> <p>RT-PCR:</p> <p>Células HEK-hTLR5 con flagelina o HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La administración exógena de HMGB1 o flagelina i.pl. induce alodinia mecánica que es atenuada por TH1020 antagonista del receptor TLR-5. • HMGB1-TLR-5, activa la vía de señalización NF-κB y liberación de TNFα, IL-8 e iNOS. • Los residuos de la cola ácida de HMGB1 (aá 185-215) son necesarios para el reconocimiento de la proteína a través del receptor TLR-5. 	<ul style="list-style-type: none"> • HMGB1 induce hipersensibilidad al dolor a través del receptor TLR-5. 	<p>(95)</p>

<p>Dolor de vejiga inducido por cistitis en ratón.</p> <p>(Hiperalgnesia mecánica referida, conductas nociceptivas: lamidas y sacudidas espontaneas).</p>	<p>Tratamiento i.p. con:</p> <p>Ab anti-HMGB1 (2 mg/kg).</p> <p>TM (0.1-10 mg/kg).</p> <p>HMGB1 (0.4 mg/kg).</p> <p>HBPM (0.05-5 mg/kg).</p> <p>LPS-RS (0.25-2.5 mg/kg).</p> <p>Técnicas:</p> <p>WB, ELISA, IHC, RT-PCR para detectar HMGB1 en DRG y vejiga, plasma, células uroteliales respectivamente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> •HMGB1 facilita el dolor de vejiga y la hiperalgnesia referida inducido por ciclofosfamida. •El Ab anti-HMGB1, TM, y HBPM, pero no LPS-RS reducen las conductas dolorosas y la hiperalgnesia referida inducidos por cistitis. •En ratones con cistitis la expresión de HMGB1 disminuyó en células uroteliales de vejiga, pero no se detectó cambios en plasma o DRG. •No se encontraron cambios en el ARNm de HMGB1, RAGE o TLR-4 en ratones con dolor inducido por cistitis. 	<ul style="list-style-type: none"> •HMGB1 desempeña un papel pronociceptivo en el dolor de vejiga inducido por ciclofosfamida en ratón probablemente mediante el receptor RAGE, pero no TLR-4. 	(133)
<p>Dolor de vejiga inducido por PA-PAR4 en ratón.</p> <p>(Hipersensibilidad mecánica abdominal).</p>	<p>Tratamiento i.p. con: GL (50 mg/kg).</p> <p>El antagonista MIF ISO-1 (20 mg/kg).</p> <p><u>Técnicas:</u></p> <p>WB de células uroteliales de humano para HMGB1.</p> <p>IHC de vejiga de ratón para HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> •La hipersensibilidad abdominal inducida por PA-PAR4 fue revertida por la GL. •La activación de PAR4 indujo la liberación de HMGB1 en el líquido intravesical y disminuyó en un 41.7% los niveles uroteliales de HMGB1. •El pretratamiento con el antagonista de MIF previno la disminución de HMGB1 del tejido urotelial. 	<p>El dolor de vejiga inducido por la activación de PAR4 depende de la liberación de HMGB1 a través de un mecanismo dependiente de MIF.</p>	(134)
<p>Abreviaturas: Ab: anticuerpo; DRG, ganglio de la raíz dorsal; GL: glicirricina; _aHMGB1: isoforma todo tiol; _{ds}HMGB1: isoforma disulfuro; HBPM: heparina de bajo peso molecular; i.p.: intraperitoneal; i.pl.: intraplantar; i.t.: intratecal; IHC: Inmunohistoquímica; ME: médula espinal; MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos; PA-PAR4: péptido activador del receptor activado por proteasa 4; TM o TMα: trombomodulina-α; WB: <i>western blot</i>.</p> <p>Nota: HBPM y FPS-ZM1 son antagonistas de RAGE; LPS-RS, IN-C34 y TAK-242 son antagonistas de TLR-4; TH1020 es antagonista de TLR-5; ADM3100 es Inhibidor de CXCR4; ISO-1 es antagonista de MIF; Fluorocitrato y L-2AA son inhibidores de la activación de astrocitos.</p>				

2.3.2. HMGB1 en el dolor crónico

El dolor crónico es la principal causa de sufrimiento a nivel mundial. Desde el punto de vista clínico se considera que existe dolor crónico cuando se presenta de forma constante por al menos cuatro o cinco días a la semana, y que perdura por al menos 3 meses (27). Sin embargo, puede durar incluso años hasta convertirse en un síntoma debilitante derivado de una enfermedad como el caso de la neuropatía diabética o incluso la enfermedad por sí misma como la fibromialgia. Con base en lo anterior el dolor crónico es un término que se utiliza para englobar a un gran número de enfermedades de diversas etiologías que cursan con dolor por períodos largos de tiempo. Las etiologías más comunes son lesión nerviosa, cirugías, quemaduras, fármacos como los utilizados en la quimioterapia y enfermedades metabólicas o infecciosas. En este contexto, los tipos de dolor crónico más comunes son el dolor neuropático, dolor musculoesquelético, dolor post-quirúrgico o postraumático, dolor orofacial y dolor crónico generalizado como resultado de enfermedades como herpes, diabetes mellitus, artritis y fibromialgia (27, 135)

El dolor neuropático se define como “el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial” y es uno de los tipos de dolor crónico más debilitante y difícil de tratar (136). De acuerdo al sitio de la lesión los síndromes de dolor neuropático se clasifican en periféricos, si la lesión se produce a nivel de los nervios que inervan los tejidos o centrales, cuando la lesión se produce en la médula espinal o cerebro (27). La lesión en el sistema nervioso periférico o central puede ser el resultado de compresión mecánica, traumatismos, alteraciones metabólicas, o por el uso de fármacos neurotóxicos. En este sentido se han implementado una gran diversidad de modelos de dolor neuropático en donde la lesión de nervios periféricos se induce quirúrgicamente. Los nervios que más frecuentemente se lesionan por distintas aproximaciones para producir dolor neuropático son el nervio tibial, el nervio ciático o bien las raíces espinales lumbares.

Dada la importancia del dolor neuropático y la gran diversidad de síndromes que existen, el papel que desempeña HMGB1 en este tipo de dolor ha sido estudiado ampliamente en una gran diversidad de modelos animales. En este sentido existen estudios realizados en modelos de dolor neuropático inducidos por métodos quirúrgicos (tabla 2), por enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus o por quimioterapia (tabla 3). A

continuación, se describirán los principales hallazgos encontrados en modelos de dolor neuropático inducidos quirúrgicamente. En primer lugar, es importante destacar que en todos los modelos empleados ya sea en rata o ratón se desarrollaron conductas nociceptivas tales como alodinia mecánica e hiperalgesia térmica de larga duración (hasta 28 días post-cirugía) que evidencian hipersensibilidad al dolor. La conducta más empleada fue la alodinia mecánica y se cuantificó mediante filamentos de von frey. En estos modelos la hipersensibilidad al dolor fue atenuada por el tratamiento repetido con el inhibidor de HMGB1 glicirricina (137, 138), con Ab específicos anti-HMGB1 administrados a nivel periférico (i.p.; i.v.; periciático) (126, 139, 140) o central (i.t) (106, 127), o bien cuando se indujo la sobreexpresión de los pequeños RNA de interferencia (miR-142-3p, miR-141, miR-381, miR-129-5p) (141-144) cuyo blanco es el gen de HMGB1 y que en condiciones de dolor neuropático se encontraron disminuidos. Además, el análisis de la expresión de la proteína o del ARNm de HMGB1 por *Western blot* o inmunohistoquímica mostro que en todos los modelos de dolor neuropático utilizados se produjo un incremento de la expresión de HMGB1 en la región lumbar de la médula espinal y los DRG L4-L6, ambos sitios importantes para el procesamiento del dolor. Otros tejidos en donde también se ha detectado un incremento en la expresión de HMGB1 fue la corteza del cíngulo anterior y el plasma de ratones a los que se les indujo dolor neuropático mediante la ligadura parcial del nervio ciático, 8 semanas después de la cirugía (138). El incremento en la expresión de HMGB1 se revirtió con el tratamiento con Glicirricina, Ab anti-HMGB1 o pequeños ARN de interferencia. Otro hallazgo importante fue que en condiciones de dolor neuropático HMGB1 se asoció con la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α ; IL-1 α , IL-6 a nivel de la médula espinal (126, 143-145). Para corroborar de donde provienen estas citocinas se realizaron estudios de inmunohistoquímica en donde se observó que HMGB1 co-localizó con marcadores de microglía (Iba1), astrocitos (GFAP) y macrófagos, y que esta co-localización incrementa la inmunoreactividad a estos marcadores en condiciones de dolor (127, 139, 140). Adicionalmente, estos estudios han permitido observar cambios en la morfología de la microglía lo que ha sugiere un estado de activación. Todo lo anterior sugiere que HMGB1 se libera de la microglía y macrófagos y que produce sus efectos pronociceptivos mediante la activación de la microglía y la liberación de mediadores proinflamatorios. Sin embargo, la pregunta que surgió es si HMGB1 se liberaba del núcleo,

para esto se realizaron estudios *in vitro* en líneas neuronales y de macrófagos en donde se observó que HMGB1 se transloca del núcleo al citoplasma y posteriormente se libera al espacio extracelular (137, 139). Finalmente, se ha intentado determinar a través de que receptores HMGB1 ejerce sus efectos en el dolor neuropático. Los estudios farmacológicos y conductuales sugieren que HMGB1 activa a los receptores TLR-4 (146), RAGE (147), CXR4 (142).

Tabla 2. HMGB1 en el dolor neuropático inducido por métodos quirúrgicos

Modelo de dolor/ (prueba conductual)	Tratamiento / técnicas moleculares	Resultados	Conclusión	Ref.
Dolor neuropático inducido por aplicación del núcleo pulposo en el DRG en rata (Alodinia mecánica)	Tratamiento: Ab anti-HMGB1 (200 µg, i.p.) 12 y 36 h post-cirugía. Técnicas: IHC del DRG para ATF3, HMGB1, TNF-α y MΦ. WB de DRG para HMGB1, IL-1β y TNF-α.	<ul style="list-style-type: none"> • La inyección i.p. de anti-HMGB1 revirtió la alodinia inducida por la aplicación del núcleo pulposo. • El núcleo pulposo rodeó el DRG y se observó un mayor no. de MΦ. • HMGB1 co-localizó con TNF-α en macrófagos del DRG. • El Ab anti-HMGB1 disminuyó el no. de neuronas que ATF-3⁺ en el DRG. 	HMGB1 secretado de macrófagos desempeña un papel pronociceptivo en el dolor neuropático inducido por aplicación del núcleo pulposo en el DRG	(140)
Dolor neuropático inducido por lesión del nervio tibial (TNI) en rata. (Alodinia mecánica)	Tratamiento agudo con una dosis de GL (50 y 100 mg/kg, i.p.) Tratamiento repetido GL 50 mg/kg/ día por cuatro días. Técnicas: IHC del DRG L4-5 para HMGB1 y ATF-3 WB de DRG L4-5 para HMGB1.	<ul style="list-style-type: none"> • La TNI produjo alodinia mecánica hasta por 64 días y la traslocación de HMGB1 del núcleo al citoplasma de las neuronas del DRG L4-5. • La administración de GL revirtió la alodinia mecánica inducida por TNI 14 días y 3 meses post-cirugía. • HMGB1 obtenida de neuronas de ratas naïve o TNI produjo excitación de neuronas sensoriales. 	La HMGB1 que se libera persistentemente del núcleo actúa como un modulador de la excitabilidad neuronal y desempeña un papel pronociceptivo en el dolor neuropático inducido por TNI.	(137)
Dolor neuropático inducido por la ligadura parcial del nervio ciático (PSNL) en rata. (Alodinia mecánica)	Tratamiento: Ab anti-HMGB1 (2 mg/kg, i.v.). Técnicas: WB de L4-6 DRG. IHC de ME, para GFAP (marcador de astrocitos); Iba1 (marcador de microglía); NeuN (marcador de neuronas).	<ul style="list-style-type: none"> • La PSNL produjo hipersensibilidad mecánica y un incremento de la expresión de la proteína de HMGB1 en la ME del día 7 al día 21 post-PSNL. • El Ab anti-HMGB1 revirtió la alodinia mecánica los días 7, 14 y 21 post-PSNL. • <i>In vitro</i>, HMGB1 transloco del núcleo al citoplasma de neuronas, mientras que en la glía y astrocitos permaneció en el núcleo. 	El daño al nervio ciático favorece la síntesis y liberación de HMGB1 desde neuronas y la microglía en la ME, lo que favorece el desarrollo del dolor neuropático.	(139)

		<ul style="list-style-type: none"> • PSNL incrementó la expresión de células GFAP⁺ e Iba1⁺. El Ab de anti-HMGB1 disminuyó la expresión de Iba1 y cFos. 		
Dolor neuropático inducido por la ligadura parcial del nervio ciático (PSNL) en ratón.	<p>Tratamiento agudo con el Ab anti-HMGB1 (10 ng y 1 µg/10µl, peri-ciático en el día 14 post-cirugía)</p> <p>Tratamiento repetido con el Ab HMGB1 (1, 3 y 10 ng/10µl, peri-ciático en los días 7, 9, 11 y 13 post-cirugía)</p> <p>Técnicas:</p> <p>WB del nervio ciático para HMGB1 y MMP-9</p> <p>IHC del nervio ciático para HMGB1, S100b y MMP-9.</p> <p>RT-PCR del nervio ciático para TNF-α, IL-1β y -6, CCL2, MMP-9 y -2, TIMP-1, COX-2 e iNOS.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La PSNL produjo hipersensibilidad mecánica e incrementó la expresión de HMGB1 en macrófagos y células de Schwann del nervio ipsilateral desde el día 3 hasta el 21 post-cirugía. • El tratamiento perineural repetido con el Ab anti-HMGB1 disminuyó la hipersensibilidad mecánica y la expresión de MMP-9, pero no del resto de los mediadores inflamatorios el día 14 post- PSNL. 	La sobreexpresión de HMGB1 es importante en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por PSNL.	(126)
(Alodinia mecánica)	<p>Tratamiento agudo con el Ab anti-HMGB1 (1 µg/5µL, i.t.)</p> <p>Tratamiento repetido a la dosis de 10 ng/5µL, i.t.) los días 7, 9, 11 y 13 días post-cirugía.</p> <p>Técnicas: IHC de ME para HMGB1, GFAP e Iba1 marcadores de microglía y astrocitos, respectivamente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La administración repetida de anti-HMGB1 disminuyó la hipersensibilidad mecánica inducida por PSNL • La PSNL incrementó la inmunoreactividad de GFAP e Iba1 en ME el día 14 post-cirugía. Este incremento fue revertido por el tratamiento con el Ab anti-HMGB1. 	El papel pronociceptivo de HMGB1 en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por PSLN depende de la activación de la microglía y los astrocitos.	(127)
Dolor neuropático inducido por ligadura parcial del nervio ciático (PSNL) en ratón. (Alodinia mecánica, conductas tipo ansioso-depresivas)	<p>Tratamiento:</p> <p>Ácido glicirrónico (GZA, 10 mg/kg/día por 8 semanas).</p> <p>Ab anti-HMGB1 (4 mg/kg por 7 semanas)</p> <p>Técnicas:</p> <p>RT-PCR: Tejido de corteza e hipocampo.</p> <p>WB de corteza e hipotálamo para HMGB1, TNF-α, IL-1β, -6, y -18,</p> <p>ELISA: para HMGB1.</p> <p>IHC: tejido de la corteza del cíngulo anterior</p>	<ul style="list-style-type: none"> • PSNL indujo alodinia mecánica acompañada de conductas ansioso-depresivas 8 semanas post-cirugía. • PSNL incrementó la expresión de la proteína de HMGB1 en la corteza del cíngulo anterior y en el plasma 8 semanas post-PSNL. • PSNL incrementó la inmunoreactividad a Iba1 y la microglía reactiva en la corteza del cíngulo anterior 8 semanas post-PSNL. • El tratamiento crónico con GZA o el Ab anti-HMGB1 disminuyó las conductas tipo ansioso-depresivas, la activación de la microglía en la corteza del cíngulo anterior y los niveles de HMGB1 en plasma, pero no afectó la alodinia mecánica. 	HMGB1 participa en el desarrollo de conductas tipo ansioso-depresivas a través de la activación de la microglía en centros superiores como la corteza del cíngulo anterior.	(138)

<p>Dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L4-L5 en rata.</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)</p>	<p>Tratamiento: Ab anti-HMGB1 (1.6 mg/kg/día por 7 días. i.t.)</p> <p>Técnicas: IHC: Para HMGB1 y RAGE. RT-PCR para medir niveles de HMGB1 en DRG y nervios espinales</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La ligadura de los nervios espinales indujo alodinia mecánica e hiperalgesia térmica con incremento del ARNm de HMGB1 en los DRG L4-L5 a partir del día uno y que perdura hasta el día 7 post-cirugía. • El Ab anti-HMGB1 revierte la alodinia mecánica, pero no la alodinia térmica inducida por la ligadura de los nervios espinales a partir del día 3 y hasta el día 7 post-cirugía. 	<p>HMGB1 desempeña un papel importante en el desarrollo de hipersensibilidad al dolor que se produce después del daño a los nervios.</p>	<p>(106)</p>
<p>Dolor neuropático inducido por la ligadura del nervio espinal L5 en rata</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)</p>	<p>Técnicas: RT-PCR de ME para HMGB1 y TLR-4. WB de ME para HMGB1 y TLR-4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La ligadura de nervios espinales indujo alodinia mecánica e hiperalgesia térmica con incremento de la proteína y el ARNm de HMGB1 y TLR-4 en la ME a partir del día 3 y hasta el 14 post-cirugía. 	<p>HMGB1 y TLR-4 participan en el inicio y el mantenimiento del dolor neuropático inducido por ligadura de nervios espinales</p>	<p>(146)</p>
<p>Dolor neuropático inducido por la ligadura del nervio espinal L4 (SNL) en ratón.</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)</p>	<p>VL-miR-142-3p (8x10⁵ UT en 1 µl, i.t.). siARN de HMGB1 (50 µg en un µl, i.t.).</p> <p>Técnicas: RT-PCR y WB de DRG para miR-142-3p y HMGB1. ELISA de DRG para TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La SNL disminuyó la expresión de miR142-3p en el DRG los días 3, 7, 14 y 21 post-SNL. • LV-miR-142-3p incrementó la expresión de miR142-3p en el DRG y disminuyó la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica los días 3, 7, 14 y 21 post-SNL. • La sobreexpresión de miR-142-3p disminuyó significativamente la expresión del ARNm y la proteína de HMGB1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, así como los niveles de TNF-α, IL-1β, IL-6. • La expresión del ARNm HMGB1 correlacionó negativamente con los niveles de miR142-3p. 	<p>La disminución de la expresión de miR142-3p lleva a la sobreexpresión de HMGB1 que contribuye al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático inducido por SNL.</p>	<p>(144)</p>
<p>Dolor neuropático inducido por constricción crónica del nervio ciático (CCI) en rata</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)</p>	<p>Tratamiento: Vector recombinante de IL-10 (10µL, i.t.).</p> <p>Técnicas: ELISA: Para IL-10, IL-1β, IL-6 y TNF-α. IHC: Asta dorsal de la ME (ADME) para detección de HMGB1. WB: ADME para expresión de HMGB1 y RAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La CCI incrementó la expresión en el ADME de HMGB1 desde el día 3 hasta el 28 post-CCI; así como de su receptor RAGE a partir del día 14 post-CCI • En los animales tratados con el vector recombinante de IL-10 no se observó este aumento en la expresión de HMGB1 y RAGE 	<p>La alarmina HMGB1 participa en el inicio y mantenimiento del dolor neuropático inducido por CCI, su participación esta mediada por el receptor RAGE</p>	<p>(147)</p>

	<p>Tratamiento:</p> <p>miR-141 (LV-miR-141, 10 μl, i.t.)</p> <p>Técnicas:</p> <p>qRT-PCR: ME L4-5 y DRG, para ARN total.</p> <p>ELISA: Para IL-1β y IL-6, TNF-α.</p> <p>WB para p65 y HMGB1</p> <p>Ensayo dual de luciferasa: El 3'UTR de HMGB1 con miR-141</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La CCI disminuyó la expresión de miR-141 en DRG e incrementa la expresión de HMGB1. • La sobre expresión de miR-141 revirtió la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica inducida por CCI, adicionalmente suprimió la expresión de la proteína y el ARNm de HMGB1 <i>in vivo e in vitro</i>. 	<p>HMGB1 regula de forma negativa la expresión de miR-141 en el dolor neuropático por CCI</p>	(143)
	<p>Tratamiento:</p> <p>MIP (500 μM, i.t.) En 2 esquemas:</p> <p>Pretratamiento: diario por 3 días pre-CCI</p> <p>Postratamiento: diario del día 3 al 5 post-CCI</p> <p>Técnicas:</p> <p>WB: DRG de L4-6 para IL-1β, HMGB1, MyD88, TRIF, NF-kβ-p65, NF-kβ-p65 fosforilado, ERK, ERK fosforilado y TNF-α.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El pretratamiento y el post-tratamiento con MIP revirtieron la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica inducida por CCI • La lesión por CCI incrementó la expresión de HMGB1 desde el día 1 hasta el 21 post-CCI en el ADME y los DRG L4-L6. 	<p>HMGB1 es regulado positivamente tras la lesión periférica en sitios estratégicos de la vía nociceptiva</p>	(145)
<p>Dolor neuropático inducido por constricción crónica del nervio ciático (CCI) en rata</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)</p>	<p>Tratamiento:</p> <p>LV-miR-381, i.t.</p> <p>LV-shHMGB1, i.t.</p> <p>LV-shCXCR4, i.t.</p> <p>Técnicas:</p> <p>qRT-PCR: El ARN total, para U6, miR-381, CXCR4, HMGB1.</p> <p>Ensayo de luciferasa: El 3'UTR de HMGB1/CXCR4.</p> <p>WB: Proteínas de HMGB1 y CXCR4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La lesión inducida por CCI disminuyó la expresión de miR-381 e incrementó la proteína y el ARNm de HMGB1 y CXCR4 desde el día 3 hasta el 14 post-CCI. • La sobre expresión de miR-381 disminuyó el ARNm y la expresión proteica de HMGB1 y CXCR4. • El silenciamiento de HMGB1 y CXCR4 tuvo efectos benéficos sobre la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica. 	<p>HMGB1 y CXCR4 contribuyen al dolor neuropático y se asocia con la disminución de miR-381</p>	(142)
<p>Dolor neuropático por constricción crónica bilateral en rata</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgesia térmica)</p>	<p>Tratamiento:</p> <p>VL-miR-129-5p, (LV-miR-29-5p, 10 μl, i.t.).</p> <p>LV-HMGB1 (LV-HMGB1, 10 μl, i.t.).</p> <p>Técnicas:</p> <p>qRT-PCR para miR-129-5p y HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La lesión bilateral inducida por CCI produjo alodinia mecánica e hiperalgesia térmica de larga duración, una disminución de la expresión miR-129-5p y un incremento del ARNm y la proteína de HMGB1 en la ME. • La sobreexpresión de miR-129-5p disminuyó la expresión de HMGB1 y revirtió la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica 	<p>HMGB1 regula el dolor neuropático por medio de la disminución en la expresión de miR-129-5p.</p>	(141)

	WB: Para HMGB1.			
<p>Abreviaturas: Ab: anticuerpo; DRG, ganglio de la raíz dorsal; GL: glicirricina; i.p.: intraperitoneal; i.pl.: intraplantar; i.t.; intratecal; IHC: Inmunohistoquímica; LV: Vector lentiviral; ME: médula espinal; MIP: Péptido inhibidor del homodímero MyD88; miR: micro ARN de interferencia; WB: western blot.</p> <p>Nota: NeuN es un marcador de Neuronas; GFAP es un marcador de astrocitos; Iba1 es marcador de microglía</p>				

2.3.3. Dolor crónico por neuropatía diabética y neuropatía inducida por quimioterapia

El dolor crónico secundario está relacionado con una enfermedad como la causa subyacente, por lo que el dolor se considera inicialmente como un síntoma altamente debilitante (27). Existen diferentes categorías de dolor crónico secundario entre las que encontramos el dolor neuropático periférico que se origina principalmente por daño a los nervios, que inervan los distintos tejidos, ya sea por traumatismo, por enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus, o bien por el uso de fármacos neurotóxicos como es el caso de los diferentes fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer (98) dando lugar a síndromes dolorosos crónicos como la neuropatía diabética y la neuropatía inducida por quimioterapia. Ambas patologías son difíciles de tratar debido en parte a que no se conocen con exactitud los mecanismos que favorecen el desarrollo y el mantenimiento del dolor crónico en estas condiciones. Debido a lo anterior existe el interés de elucidar dichos mecanismos. En este contexto, y dado que HMGB1 ha demostrado un papel importante en el procesamiento del dolor, se ha investigado si esta alarmina participa en el desarrollo y mantenimiento del dolor que se produce como consecuencia de la lesión nerviosa, así como las diversas vías de señalización que se activan como consecuencia de los efectos extracelulares de HMGB1 y su interacción con diferentes PRRs en condiciones de diabetes mellitus. Para esto se han utilizado modelos preclínicos de diabetes ya sea inducidos genéticamente (148, 149) o bien por la inyección de estreptozotocina (STZ) (150, 151) en roedores. En modelos genéticos como los ratones ob/ob producidos por mutaciones en el gen de leptina o en ratas espontáneamente diabéticas se ha observado el desarrollo de o alodinia mecánica e hiperalgesia térmica de larga duración que se manifiesta a partir de las 8 o 10 semanas de edad, respectivamente. Además, cuando las conductas nociceptivas ya

están establecidas se ha detectado un incremento en la expresión de la proteína de HMGB1 en sitios importantes para el procesamiento del dolor como lo son la región lumbar de la médula espinal y el DRG, así como de diferentes citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , de TLR-4, y un incremento de la inmunoreactividad de GFAP un marcado de astrocitos. En la misma línea de hallazgos se observó que las manifestaciones de hipersensibilidad al dolor se revierten con el tratamiento repetido de un Ab anti-HMGB1 o el inhibidor de HMGB1 glicirricina. Ambos tratamientos también revirtieron el incremento de las citocinas proinflamatorias y de la inmunoreactividad de GFAP. Estos hallazgos en conjunto muestran que HMGB1 desempeña un papel importante en la neuropatía diabética mediante la liberación de citocinas proinflamatorias (148, 149). De forma similar, en un modelo de diabetes inducido por la administración de STZ en rata se observó el desarrollo de hipersensibilidad al dolor acompañado de un incremento de HMGB1 y RAGE en el DRG y la médula espinal (150). Asimismo, en un modelo de neuropatía diabética en ratón se observó el desarrollo de alodinia mecánica acompañada de la disminución de miR-193a cuyo gen blanco es HMGB1. En concordancia con esto se observó un incremento de la expresión de HMGB1 en la médula espinal. Para corroborar esto, en ratones neuropáticos se indujo la sobreexpresión de miR-193a, lo cual previno la sobreexpresión de HMGB, así como de la proteína y el ARNm de IL-6, IL-1 β y TN- α , y revirtió la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica (151). Estos estudios evidencian el papel crítico que desempeña HMGB1 en el desarrollo de hipersensibilidad al dolor en condiciones de diabetes y su asociación el aumento de citocinas proinflamatorias en sitios relevantes de la vía del dolor.

Por otro lado, cabe mencionar que se encontraron resultados similares en modelos preclínicos de neuropatía periférica inducida por los agentes quimioterapéuticos paclitaxel (129, 152), vincristina (129) y oxaliplatino (153, 154). En todos los modelos de neuropatía inducida por quimioterapia se observó el desarrollo de conductas nociceptivas que evidencian hipersensibilidad al dolor. Sin embargo, la inducción de neuropatía con paclitaxel o vincristina disminuyeron la expresión de la proteína de HMGB1 en el DRG (129) mientras que en los otros modelos no se detectaron cambios. También en todos los modelos se observó que el co-tratamiento o el post-tratamiento con el anticuerpo anti-HMGB1 previno o revirtió la alodinia mecánica inducida por los diferentes agentes quimioterapéuticos. Asimismo, el tratamiento con trombomodulina, una proteína que

degrada HMGB1, también revirtió las conductas nociceptivas. Estos resultados en conjunto sugieren que HMGB1 participa en el desarrollo y el mantenimiento de la neuropatía inducida por quimioterapia. En cuanto a cómo HMGB1 ejerce sus efectos, se observó que en la neuropatía inducida por paclitaxel, vincristina u oxaliplatino el tratamiento intraplantar con los antagonistas de TLR-4, RAGE y CXCR4 revirtió la alodinia mecánica sugiriendo que HMGB1 ejerce sus efectos pronociceptivas a través de estos receptores. Por otro lado, a través de técnicas moleculares como *Western blot*, ELISA y RT-PCR se ha estudiado la expresión de HMGB1 y sus receptores en tejidos como el nervio ciático, el DRG, y la médula espinal. Se encontró que HMGB1, TLR-4, RAGE y CXCR4 se expresan en el nervio ciático. De forma más específica HMGB1 co-localizó con TLR-4, RAGE en neuronas NF200⁺ y células de Schwann del nervio ciático, así como en macrófagos (129). Lo anterior sugiere que HMGB1 se expresa en fibras sensoriales altamente mielinizadas. En macrófagos del nervio ciático, además se observó un incremento en la expresión de RAGE y CXCR4 y macrófagos (152). Esto sugiere que HMGB1 ejerce sus efectos en neuronas y en células del sistema inmune particularmente macrófagos. Para confirmar esto, se realizaron estudios *in vitro* en líneas células neuronales y de macrófagos y se encontró que oxaliplatino estimula la liberación de HMGB1 a partir de neuronas y macrófagos y este efecto fue revertido por un antagonista de TLR-4 y por inhibidores de PI3K, Akt y MMP-9. Esto sugiere que existe una comunicación además entre neuronas y macrófagos mediada por HMGB1 a través de la vía de señalización HMGB1-TLR-4-PI3K/Akt-MMP-9 (154). Todos estos resultados en conjunto muestran que HMGB1 participa en el desarrollo y el mantenimiento del dolor crónico que se produce como una consecuencia del daño al nervio que se produce por hiperglicemia, en el caso de los modelos diabetes mellitus o bien por agentes neurotóxicos como lo son los agentes antineoplásicos.

Tabla 3. Participación HMGB1 en la neuropatía diabética y en la neuropatía inducida por quimioterapia.

Modelo de dolor/ (conducta nociceptiva)	Tratamientos y técnicas moleculares empleadas	Resultados	Conclusiones	Ref.
Neuropatía diabética en ratón ob/ob (Alodinia mecánica)	<p>Tratamiento con Ab anti-HMGB1 (1, 10 y 50 µg/3 µL, i.t.).</p> <p>Técnicas:</p> <p>WB: de región lumbar de la ME para HMGB1 y GFAP.</p> <p>IHC de ME L5 para GFAP</p> <p>RT-PCR de ME para IL-1β, -IL-6, y TNF-α.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La DMT2 produjo alodinia mecánica a partir del mes postnatal 2, e incrementó la expresión de HMGB1 en la ME del mes posnatal 2 al 5. • En el mes postnatal 4 la DMT2 incrementó la expresión de GFAP, TNF-α, IL-1β, IL-6 y MCP-1 • El Ab anti-HMGB1 redujo la alodinia mecánica inducida por DMT2 de manera dependiente de la dosis, y revirtió el incremento de la expresión de GFAP, IL-1β, IL-6 y MCP-1 inducido por la DMT2. 	<p>HMGB1 se encuentra sobre expresada en condiciones de DMT2 en la ME y desempeña un papel pronociceptivo a través de la modulación de citocinas proinflamatorias.</p>	(148)
Neuropatía diabética rata espontáneamente diabética Alodinia mecánica, hiperalgnesia térmica	<p>Tratamiento repetido con GL (50 mg/kg, una vez al día, 5 días a la semana por 4 semanas, i.p.).</p> <p>Técnicas:</p> <p>WB de L4-6 DRG y ME, para HMGB1, RAGE, HMGB1ac, TLR-4, pJNK, NLRP3, TRPC6.</p> <p>IHC de DRG para HMGB1, H3K9 y CXCR4.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Las ratas espontáneamente diabéticas mostraron alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica a partir de las 10 semanas de edad que fueron atenuadas por el tratamiento con GL. • Se observó un incremento en la expresión de NLRP3, HMGB1, y TLR-4 en el DRG de ratas con 8 semanas de DM que fue revertido por el tratamiento con GL. • La GL previno la liberación de HMGB1 del citoplasma al espacio extracelular inducida por la hiperglicemia en neuronas de la ME y del DRG. • La GL disminuyó la expresión de TRPC6 y la activación de cJNK en neuronas de la ME de ratas espontáneamente diabéticas. 	<p>El incremento en la expresión de HMGB1 es importante en el desarrollo de neuropatía diabética en DMT2.</p> <p>La inhibición de HMGB1 puede revertir los cambios en la expresión de HMGB1, TLR-4, y NLRP3 en neuronas del DRG de ratas diabéticas.</p>	(149)

<p>Neuropatía diabética inducida por una dosis de STZ en rata.</p> <p>Alodinia mecánica, hiperalgesia térmica</p>	<p>Técnicas:</p> <p>WB piel y DRG L3-5, para TRPV1, p800-TRPV1 y HMGB1.</p> <p>IHC de DRG para RAGE y NeuN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La hiperglicemia inducida por STZ produjo alodinia mecánica e hiperalgesia térmica a las 3 semanas post-inducción. • Se observó un incremento de HMGB1 en piel 3 y 7 semanas post-STZ y de RAGE en neuronas del DRG 3 semanas post-STZ. 	<p>La neuropatía diabética inducida por STZ favorece el incremento en la expresión de HMGB1 y RAGE en el DRG y la piel.</p>	<p>(150)</p>
<p>Neuropatía diabética inducida por una dosis de STZ en ratón.</p> <p>(Alodinia mecánica, hiperalgesia térmica)</p>	<p>Tratamiento:</p> <p>miR-193a (2 µg/día, i.t.).</p> <p>Técnicas:</p> <p>Ensayo de luciferasa para HMGB1 3'-UTR</p> <p>qRT-PCR y ELISA: Para HMGB1, IL-6, IL-1β, TNF-α</p> <p>WB de cultivo de células, para HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La hiperglicemia inducida por STZ produjo alodinia mecánica e hiperalgesia térmica a partir de la semana 3, y se mantuvo hasta la semana 6 post-STZ. Esto se acompañó de la disminución de miR-193a y el incremento de HMGB1 en la asta dorsal de la ME. • La sobreexpresión de miR-193a revirtió la sobreexpresión de HMGB1 en la ME, así como de la proteína y el ARNm de IL-6, IL-1β y TNF-α y alivió la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica los días 7 y 14 post-STZ. 	<p>La neuropatía diabética inducida por STZ favorece la disminución de miR-193a lo que conduce al incremento en la expresión de HMGB1 en la ME quien favorece el desarrollo y mantenimiento del dolor.</p>	<p>(151)</p>

<p>Dolor neuropático inducido por quimioterapia en ratas.</p> <p>(Alodinia mecánica, hiperalgnesia térmica)</p>	<p>Co-tratamiento repetido con el Ab anti-HMGB1 (1 mg/kg, i.p.) una vez al día por 7 días al mismo que paclitaxel o dos ciclos de 5 días al igual que la administración de vincristina para inducir neuropatía.</p> <p>Post-tratamiento con el Ab anti-HMGB1 de pollo o de rata (1 mg/kg, i.p. o 50 µg/pata, i.pl.) al día 14 después del inicio de la inducción de la neuropatía con paclitaxel o vincristina.</p> <p>El inhibidor de TLR-4: LPS-RS: (50 µg/pata); el inhibidor de RAGE: HBPM (10 µg/pata) y TM (1-10 mg/kg, i.p.).</p> <p>Técnicas:</p> <p>ELISA para HMGB1 en plasma.</p> <p>WB para HMBG1, TLR-4, RAGE.</p> <p>IHC del nervio ciático para co-localizar HMGB1 con TLR-4 o RAGE.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Paclitaxel y vincristina produjeron hiperalgnesia térmica y alodinia mecánica. • El co-tratamiento repetido o el post-tratamiento con una sola dosis i.p. o i.pl. con el Ab anti-HMGB1 de pollo o rata revirtió la hiperalgnesia mecánica inducida por vincristina o paclitaxel. • El post-tratamiento i.pl. con los antagonistas de TLR-4 y RAGE revirtió la hiperalgnesia inducida por paclitaxel o vincristina. • El tratamiento con paclitaxel o vincristina redujo la expresión de la proteína de HMGB1 en el DRG, pero no en el nervio ciático, sin afectar la expresión de los receptores TLR-4 y RAGE. • HMGB1, TLR-4 y RAGE fueron detectados en neuronas NF200⁺ y células de Schwann del nervio ciático. HMGB1 co-localizó parcialmente en ambos tipos celulares. La co-localización de HMGB1 con sus receptores incrementó en células de Schwann con el tratamiento con paclitaxel. 	<p>HMGB1 desempeña un papel importante en el inicio y el mantenimiento del dolor neuropático inducido por los agentes quimioterapéuticos paclitaxel o vincristina. Los efectos de HMGB1 en la neuropatía inducida por quimioterapia están mediados por los receptores TLR-4 y RAGE</p>	<p>(129)</p>
<p>Neuropatía periférica inducida por quimioterapia en ratón.</p> <p>(Alodinia mecánica)</p>	<p>Co-tratamiento repetido (una dosis/día) los días 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 post-inducción o post-tratamiento (una dosis) el día 9 post-inducción con:</p> <p>Ab anti-HMGB1 (1 mg/kg); TM (1, 3 mg/kg, i.p.); HBPM (2.5 mg/kg, i.p.); LPS-RS (0.5 mg/kg, i.p.); El inhibidor de TLR-4: TAK242 (3 mg/kg, i.p.) y el inhibidor de CXCR4 AMD3100 (8 mg/kg, i.p.).</p> <p>Técnicas:</p> <p>ELISA en plasma para HMGB1.</p> <p>IHC de nervio ciático para MΦ</p> <p>WB de DRG y L4-L6 ME para HMGB1, RAGE, CXCR4 y TLR-4.</p> <p>Translocación de HMGB1 en MΦ <i>in vitro</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La administración repetida de paclitaxel i.p. produjo alodinia mecánica que se revirtió por el co-tratamiento con el Ab anti-HMGB1, TM y con los antagonistas de RAGE y CXCR4 y por el post-tratamiento con los mismos antagonistas. • El paclitaxel indujo un incremento en la expresión de la proteína de RAGE y CXCR4 e incremento importante de los MΦ en el nervio ciático. • Minociclina y etilpiruvato inhiben la alodinia inducida por paclitaxel • <i>In vitro</i>, paclitaxel favoreció la translocación y liberación de HMGB1 en MΦ. 	<p>HMGB1 liberada de MΦ participa en el desarrollo de neuropatía periférica inducida por paclitaxel a través de RAGE y CXCR, pero no de TLR-4.</p>	<p>(132)</p>

<p>Neuropatía periférica inducida por quimioterapia en rata y ratón. (Alodinia e hiperalgnesia mecánica, alodinia a estímulos fríos)</p>	<p>Tratamiento i.p. preventivo (1 h antes de oxaliplatino) o terapéutico (8 días después de oxaliplatino) con: Ab anti-HMGB1 (1 mg/kg). TM (1 y 10 o mg/kg; 0.1, 1, o 3 mg/kg). Los antagonistas de RAGE HBPM (2.5 mg/kg) y FPS-ZM1 (1 mg/kg). Los antagonistas de TLR-4 LPS-RS (0.5 mg/kg) y TAK-242 (3 mg/kg). El inhibidor de CXCR4 AMD3100 (8 mg/kg). Tratamiento repetido con Ab anti-HMGB1 (1 mg/kg) los días 0, 1,4,3,6,7,9 y 10 post-inducción Técnicas: ELISA en plasma para HMGB1. WB de piel, DRG y nervio ciático para HMGB1, TLR-4, RAGE, CXCR4. IHC de DRG L5 para HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Una dosis de oxaliplatino produjo alodinia mecánica en ratón que perduro al menos 8 días. Este efecto fue revertido por el Ab anti-HMGB1 el día 8 post-inducción. • Oxaliplatino no produjo cambios en la expresión de HMGB1 en la piel, DRG o nervio ciático de ratón 5h, 3 y 8 días post-inducción. Pero si un aumento en la expresión de RAGE en DRG. • TM previno y revirtió la alodinia mecánica inducida por oxaliplatino en rata y ratón • En ratas la administración repetida de oxaliplatino produjo alodinia e hiperalgnesia mecánica a partir del día 10 post-inducción y perduro hasta el día 14. Este efecto se previno por la administración repetida con el Ab anti-HMGB1. • Los antagonistas de TLR4, RAGE y CXCR4 previnieron y revirtieron la alodinia inducida por oxaliplatino. 	<p>HMGB1 participa en el desarrollo y el mantenimiento de la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino a través de la activación de TLR-4, RAGE, CXCR4.</p>	<p>(153)</p>
<p>Neuropatía periférica inducida por quimioterapia en ratón. (Alodinia mecánica)</p>	<p>Técnicas: WB de L4-5 ME y DRG para HMGB1. RT-PCR de DRG y L4-L5 ME para HMGB1 IHC de L4-5 ME para Iba1 y CGRP</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Oxaliplatino produjo alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica a partir del día 3 y que se mantuvo hasta el día 21 post-inducción. • Oxaliplatino estimuló la liberación de HMGB1 de neuronas y MΦ <i>in vitro</i>. • HMGB1 induce la liberación de MMP-9 a través de la vía TLR-4-PI3K-Akt 	<p>La vía HMGB1-TLR-4-PI3K/Akt-MMP-9 participa en el entrecruzamiento entre neuronas y MΦ que participa en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por quimioterapia.</p>	<p>(154)</p>
<p>Abreviaturas: Ab: anticuerpo; DMT2: Diabetes mellitus tipo 2; DRG, ganglio de la raíz dorsal; GL: glicirricina; HBPM: heparina de bajo peso molecular; i.p.: intraperitoneal; i.pl.: intraplantar; IHC: Inmunohistoquímica; MΦ: Macrófagos; ME: médula espinal; STZ: estreptozotocina; TM o TMα: trombomodulina-α; WB: <i>western blot</i>.</p> <p>Nota: HBPM y FPS-ZM1 son antagonistas de RAGE; LPS-RS y TAK-242 son antagonistas de TLR-4; TLR-5: TH1020; ADM3100 es inhibidor de CXCR4; Fluorocitrato y L-2AA son inhibidores de la activación de astrocitos; NeuN es un marcador de Neuronas; GFAP es un marcador de astrocitos; Iba1 es marcador de microglía, NF200 es marcador de fibras sensoriales altamente mielinizadas, CGRP es marcador de neuronas sensoriales.</p>				

2.3.4. HMGB1 en el dolor inflamatorio crónico

Existen una amplia variedad de condiciones patológicas que cursan con la presencia de dolor inflamatorio crónico, por lo que el papel de HMGB1 en este tipo de dolor también ha sido investigado (Tabla 4). Así por ejemplo en un modelo de dolor inducido por isquemia cerebral por oclusión arterial (BCAO) se observó un aumento de la proteína de HMGB1 a partir del día 3 y un aumento del receptor RAGE el día 1 después de la inducción en la médula espinal y nervio ciático que se acompaña del desarrollo de alodinia mecánica. En este modelo el tratamiento i.p. con un Ab anti-HMGB1 a dosis de 50 o 100 mg/ratón y el inhibidor selectivo de ERK, U0126 (10 mg/kg) disminuyó la alodinia mecánica de manera dependiente de la dosis (110). De forma similar en un modelo murino de dolor inflamatorio generado por pancreatitis, en donde la pancreatitis se indujo con ceruleína una sustancia que estimula las secreciones digestivas, se observó el desarrollo de hiperalgesia referida y un aumento en la migración de macrófagos al tejido pancreático. La hiperalgesia, pero no la pancreatitis, fue prevenida por el tratamiento con el Ab anti-HMGB1 o con los antagonistas de RAGE y CXCR4 (155). Asimismo, en el dolor inflamatorio inducido por la administración del adyuvante completo de Freud (CFA) en rata o ratón, se produjo hiperalgesia mecánica e hiperalgesia térmica que perdura por al menos 7 días, además de un incremento de la expresión de HMGB1 que es suprimido por la sobreexpresión de miR-141-3p (156). Mientras que en otro estudio se observó un incremento de la expresión de HMGB1, TLR-4 y NF- κ B p65, y el ARNm de IL-1 β y TNF- α a nivel de la corteza del cíngulo anterior. El uso de GL a la dosis de 4 mg/ml por 5 días revirtió la hipersensibilidad desarrollada, resaltando la importancia de la vía HMGB1/TLR-4/NF- κ B p65 en el desarrollo del dolor inducido por CFA (157). Finalmente, en el dolor inflamatorio crónico inducido por artritis, se observó el incremento del ARNm de HMGB1 en la articulación, así como la presencia de hiperalgesia mecánica que se mantuvo por 16 días. La administración de un Ab anti-HMGB1 revirtió la hipersensibilidad mecánica solo en machos, pero no en hembras. Mientras que al evaluar el efecto de la isoforma dsHMGB1 se observó que esta incrementó los niveles de citocinas proinflamatorias en mayor proporción en machos que hembras (158). Todos estos hallazgos en conjunto muestran que HMGB1 participa en el desarrollo y el mantenimiento del dolor inflamatorio crónico de distintas etiologías a través de la activación de la vía del receptor TLR-4/NF- κ B p65.

Dado que la evidencia sugiere la participación de HMGB1 en el dolor crónico no maligno, resulta interesante saber si también participa en el dolor crónico maligno como lo es el dolor óseo inducido por cáncer. En este sentido existe un estudio en donde utilizando un modelo de dolor óseo inducido por cáncer (CIBP) se observó el desarrollo de hipersensibilidad mecánica e hiperalgesia térmica con un incremento en la expresión de HMGB1 a nivel de la médula espinal de forma dependiente del tiempo. Además, se encontró que la sobreexpresión de miR-300 revirtió la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica y disminuyó la expresión de HMGB1 (154). Estos resultados sugieren que HMGB1 participa en el desarrollo de dolor oncológico.

Tabla 4. Participación de HMGB1 en el dolor inflamatorio crónico

Modelo de dolor/ (Conducta nociceptiva)	Tratamiento / técnicas moleculares empleadas	Resultados	Conclusiones	Ref.
Dolor crónico inducido por isquemia cerebral (BCAO) en ratón (Alodinia mecánica)	Tratamiento: Ab anti-HMGB1 (50 o 100 mg/ratón, i.v.; o 2 o 20 mg/ratón, i.c.v. o i.t.). El inhibidor selectivo de ERK U0126 (10 mg/ratón). Técnicas: WB de ME para HMGB1, RAGE, ERK y pERK. IHC de ME y nervio ciático para HMGB1.	<ul style="list-style-type: none"> • La isquemia cerebral indujo un descenso de HMGB1 el día 1, con un aumento posterior el día 3 en ME y nervio ciático con desarrollo de alodinia mecánica. • El día 1 se observó un incremento en la expresión de RAGE unido a membrana (mRAGE) y RAGE soluble (sRAGE). • El Ab anti-HMGB1 y U0126 disminuyeron la alodinia mecánica de forma dependiente de la dosis. 	HMGB1 promueve los procesos pronociceptivos a través de la vía HMGB1-RAGE en un modelo de dolor la isquemia cerebral.	(110)
Dolor crónico inflamatorio por pancreatitis inducida por ceruleína en ratón (Alodinia e hiperalgesia referida)	Tratamiento (i.p.) con: anti-HMGB1 (0.1 o 1 mg/kg). Etil piruvato (80 mg/kg). rhsTM (3 o 10 mg/kg). FPS-ZM1 (0.3 o 1 mg/kg) y HBPM (2.5 mg/kg). LPS-RS (0.5 mg/kg). El inhibidor de CXCR4 ADM300 (2.7 o 8 mg/kg, i.p.).	<ul style="list-style-type: none"> • Ceruleína indujo hiperalgesia referida que es prevenida por el Ab anti-HMGB1 o TM. • HMGB1 no aumentó en el plasma ni en el tejido pancreático, pero si la migración de MΦ al tejido. • El tratamiento con los antagonistas de RAGE y el inhibidor de CXCR4 impidieron el desarrollo de hiperalgesia, pero no el desarrollo de pancreatitis. 	La secreción local de HMGB1 por MΦ participa en el desarrollo del dolor inflamatorio en un modelo de pancreatitis a través de RAGE y CXCL12/CXCR4.	(155)
Dolor crónico inflamatorio inducido por la administración del adyuvante	Tratamiento: miR-141-3p (40 μL, i.t.). <i>In vitro</i> : células microgliales.	<ul style="list-style-type: none"> • El gen de HMGB1 es el blanco de miR-141-3p • La inyección de CFA produjo hiperalgesia mecánica y térmica que perduro por al menos 7 días. 	HMGB1 participa en el desarrollo y el mantenimiento del dolor inflamatorio.	(156)

<p>completo de Freud (CFA) en rata</p> <p>(Alodinia mecánica y térmica).</p>	<p>Técnica:</p> <p>qRT-PCR para miR-141-3p en células gliales.</p> <p>WB de ME para HMGB1.</p> <p>ELISA de ME para citocinas proinflamatorias.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CFA incrementó la expresión de HMGB1 en ME que fue revertido por el incremento en la expresión de miR-141-3p. 		
<p>Dolor crónico inflamatorio inducido por la administración del adyuvante completo de Freud (CFA) en ratones</p> <p>(Alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica)</p>	<p>Tratamiento:</p> <p>GL (4 mg/ml por 5 días).</p> <p>Técnicas:</p> <p>RT-PCR para IL6</p> <p>WB de ACC para HMGB1, TLR-4, TNF-α, IL-1β, NF-κB p65 e histona 3.</p> <p>IHC de ACC para HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CFA produjo hipersensibilidad mecánica por al menos 7 días y un incremento de la expresión de la proteína de HMGB1, TLR-4 y NF-κB p65; y del ARNm de IL-1β y TNF-α en ACC. • La hipersensibilidad inducida por CFA se revirtió por el tratamiento con GL. • El CFA indujo la activación de HMGB1 y la vía de señalización TLR-4/NF-κB y p65, lo que indujo alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica. • PAE disminuyó la expresión de HMGB1 lo que resultó en una señalización descendente de TLR-4/NF-κB y p65. El efecto de PAE es similar al generado por GL 	<p>La vía HMGB1/TLR-4/NF-κB p65 y la subsiguiente generación de citoquinas TNF-α e IL-1β participa en el desarrollo del dolor inducido por CFA.</p>	(157)
<p>Dolor inflamatorio crónico inducido por artritis (Ab anti-colágeno tipo II) en ratón</p> <p>(Alodinia mecánica)</p>	<p>Tratamiento:</p> <p>all-HMGB1 (1 μg i.art.) o ds-HMGB1 (1 μg i.art.).</p> <p>anti-HMGB1 (100 μg/ratón por 6 días).</p> <p>Técnica:</p> <p>PCR de L3-L5 DRG para TNF, CCL2, IL-6, CXCL1, CXCL2, COX2, NGF, CD34, TLR-2, RAGE, CD11b.</p> <p>IHC Para TNF, IL-6, CXCL1 a partir de cultivos de macrófagos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El Ab anti-colágeno indujo artritis e incremento la expresión el ARNm de HMGB1 en articulaciones y produjo hiperalgnesia mecánica que se mantuvo por 16 días. • El Ab anti-HMGB1 revirtió la hipersensibilidad mecánica solo en machos, pero no en hembras. • La isoforma dsHMGB1 indujo conductas nociceptivas en machos y hembras hasta por 6h. • dsHMGB1 incrementó los niveles de citocinas proinflamatorias en mayor proporción en machos que en hembras. 	<p>HMGB1 contribuye al desarrollo de dolor crónico articular inducido por la artritis, vía TLR-4.</p> <p>La isoforma ds-HMGB1, induce hipersensibilidad mecánica en ambos sexos.</p>	(158)
<p>Dolor óseo inducido por cáncer (CIBP) en rata</p> <p>(Alodinia Mecánica, hiperalgnesia térmica)</p>	<p>Tratamiento:</p> <p>miR-300 (i.t.)</p> <p>Técnicas:</p> <p>RT-PCR de ME para miR-300 y HGMB1.</p> <p>WB de ME, para HMGB1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CIBP indujo hipersensibilidad mecánica e hiperalgnesia térmica y aumento la expresión de HMGB1 en la médula espinal de manera dependiente del tiempo. • La sobreexpresión de miR-300 revirtió la alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica porque disminuyó la expresión de HMGB1. 	<p>HMGB1 desempeña un papel pronociceptivo en el desarrollo del dolor óseo inducido por cáncer.</p>	(154)

	Ensayo de Luciferasa para miR-300.			
<p>Abreviaturas: Ab: anticuerpo; DRG, ganglio de la raíz dorsal; GL: glicirricina; HBPM: heparina de bajo peso molecular; i.art.: intraarticular; IHC: Inmunohistoquímica; MΦ: Macrófagos; ME: médula espinal; WB: western blot.</p> <p>Nota: HBPM y FPS-ZM1 son antagonistas de RAGE; LPS-RS es antagonista de TLR-4; ADM3100 es inhibidor de CXCR4; U0126: inhibidor selectivo de ERK.</p>				

3. JUSTIFICACIÓN

El dolor crónico es un problema de salud pública que afecta entre el 20-25% de la población a nivel mundial. Este dolor se caracteriza por un estado de hipersensibilidad que se manifiesta con alodinia, que es una respuesta dolorosa ante los estímulos no dolorosos e hiperalgesia, incremento de la respuesta de dolor ante un estímulo no tan doloroso. Aunque actualmente no se conocen por completo los mecanismos fisiopatológicos que llevan al desarrollo y mantenimiento del dolor crónico, se sugiere una interacción bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmune, este último, como importantes contribuyentes en el inicio y mantenimiento del dolor crónico. Además, se ha propuesto que esta interacción está dada a través de alarminas, como la proteína HMGB1. La evidencia muestra que la alarmina HMGB1 desempeña un papel pronociceptivo en condiciones dolorosas en humanos como en modelos murinos de dolor agudo y crónico de tipo inflamatorio y neuropático, proceso mediado a través de diferentes receptores como los receptores tipo Toll (TLR-4 y TLR-5) y el receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) entre otros. Sin embargo, no se conoce el papel que desempeña la alarmina HMGB1 en el modelo de hipersensibilidad inducida por solución salina ácida.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Participará la proteína HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por la inyección intramuscular de solución salina ácida?

¿Cuál es el receptor mediante el cual la alarmina HMGB1 producirá sus efectos pronociceptivos en este modelo experimental?

5. HIPÓTESIS

La proteína HMGB1 participa en la hipersensibilidad al dolor inducido por la administración intramuscular repetida de solución salina ácida.

Los efectos pronociceptivos de HMGB1 en este modelo experimental están mediados por TLR-4, TLR-5 y RAGE.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Determinar el papel que desempeña la alarmina HMGB1 en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida con solución salina ácida en un modelo murino de dolor crónico y elucidar a través de que receptor HMGB1 ejerce este efecto.

6.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar el curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la inyección intramuscular repetida de solución salina ácida en ratones hembras de la cepa C57/BL6.
2. Determinar, a través del uso de glicirricina, el papel de la alarmina HMGB1 en el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la inyección intramuscular repetida de solución salina ácida.
3. Determinar, utilizando herramientas farmacológicas, si los efectos pronociceptivos de HMGB1, en el modelo de hipersensibilidad al dolor inducido por solución salina ácida están mediados por los receptores TLR-4, TLR-5, o RAGE.

7. METODOLOGÍA

7.1. Animales

En este proyecto se utilizaron ratones hembra de la cepa C57/BL6 con un peso corporal de 20-25 g al inicio del experimento. Los ratones se mantuvieron con acceso a agua y alimento *ad libitum* y con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas. Todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (**NOM-062-ZOO-1999**) (159). El protocolo utilizado fue aprobado por el comité para el cuidado y uso de animales de la Facultad de Medicina de la UAEM (CCUAL-FM-UAEM). Al finalizar los ensayos los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO₂.

7.2. Fármacos

El inhibidor de la proteína HMGB1, la glicirricina (CDS020796), el inhibidor del receptor TLR-4, TLR-4-IN-C34 (IN-C34) y el antagonista de TLR-5, TH1020 (Catálogo SML1741) fueron adquiridos en Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El antagonista de RAGE, el compuesto FPS-ZM1 (Catálogo 553030) fue obtenido de Calbiochem Millipore Corporation. Para su administración, la glicirricina y el IN-C34 fueron disueltos en solución salina 0.9%, mientras que el FPS-ZM1 y el TH1020 fueron disueltos en una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% en solución salina. Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día de su uso.

7.3. Modelo de hipersensibilidad al dolor inducida por la inyección intramuscular de solución salina ácida

En el presente proyecto la hipersensibilidad al dolor se indujo a través de un esquema dos inyecciones de solución salina ácida en el músculo gastrocnemio izquierdo de la extremidad trasera del ratón. Para ello, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina/Xilacina a una dosis de 100/10 mg/Kg. Una vez anestesiados, a los animales se les rasuró el pelo de la extremidad posterior izquierda para tener una mejor visibilidad de la zona, posteriormente se realizó la inyección de 20 µL de solución salina ácida (SSA al 0.9%, pH=4 ± 0.1) o el control también llamado grupo

Sham (PBS, 0.1M, pH=7.4) en el músculo gastrocnemio izquierdo, utilizando una aguja calibre 30 de ½ pulgada adaptada a una cánula de polietileno que está unida a una microjeringa de 10 µL. Tres días después se realizó la segunda inyección de solución salina ácida o PBS en las mismas condiciones. En nuestras condiciones experimentales, este modelo experimental produce alodinia bilateral que perdura por al menos 18 días (160) sin producir daño al tejido muscular (161).

7.4. Evaluación de la alodinia mecánica

La evaluación del desarrollo de hipersensibilidad al dolor se realizó a través del seguimiento del desarrollo de la alodinia mecánica usando filamentos de von Frey. Esta herramienta es un monofilamento calibrado en un rango de fuerza que va desde 0.007 hasta 3.24 g. Para la determinación de la alodinia se utilizó el método de *Up and Down*, el cual consiste en aplicar por 3 segundos el filamento de 0.6 g en la superficie plantar de una de las patas posteriores del ratón. Si la aplicación del filamento genera una respuesta de retirada de la pata esta se considera una respuesta positiva, mientras que si no hay reacción por parte del ratón esta se considera como una respuesta negativa. Si la respuesta es negativa, se aplica un estímulo con el siguiente filamento de mayor fuerza (arriba), mientras que si fue positiva se aplica el siguiente filamento de menor fuerza (abajo). La aplicación de los filamentos se continuó hasta identificar el primer cambio de respuesta positiva a negativa o viceversa. Una vez identificado el primer cambio se realizaron 4 mediciones consecutivas adicionales utilizando el mismo sistema de arriba y abajo. Con el patrón de respuesta obtenido y la fuerza del último filamento se calculó el 50% de umbral de retiro utilizando la siguiente fórmula:

$$50\% \text{ umbral de retiro} = [10]^{((Xf + \kappa\delta))} / 10,000$$

Donde:

Xf: Valor del último filamento utilizado (en valor logarítmico).

k: Valor asignado al patrón positivo/negativo de acuerdo de la tabla de Dixon (Dixon, 1980).

δ: La diferencia entre la fuerza de los estímulos (en valor logarítmico).

Con los valores obtenidos del 50% de umbral de retiro se construyó el curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica, en donde valores mayores a 0.8 g son considerados valores normales, es decir, ausencia de hipersensibilidad dolorosa, los valores de entre 0.8 g y 0.4 g indican la presencia de hipersensibilidad al dolor, mientras que valores menores a 0.4 g indican la presencia de alodinia mecánica.

7.5. Diseño experimental

Para dar cumplimiento a los objetivos de este proyecto se plantearon los siguientes diseños experimentales:

Objetivo particular 1. Caracterizar los cursos temporales de la alodinia mecánica inducida por la inyección intramuscular repetida de solución salina ácida en ratones hembras y machos de la cepa C57/BL6.

Para cumplir con este objetivo se utilizaron dos grupos experimentales separados por sexo, uno de hembras y uno de machos, de 8 animales cada uno. En ambos grupos se indujo un primer grupo con PBS (0.1M, pH=7.4), y un segundo grupo con SSA (SS 0.9%, pH=4 ± 0.1) siguiendo el esquema de dos inyecciones en el músculo gastrocnemio izquierdo descrito previamente. Posteriormente, se realizó la medición del 50% del umbral de retiro de ambas patas posteriores los días 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 tomado como día 0 el día de la primera inyección (Figura 14).

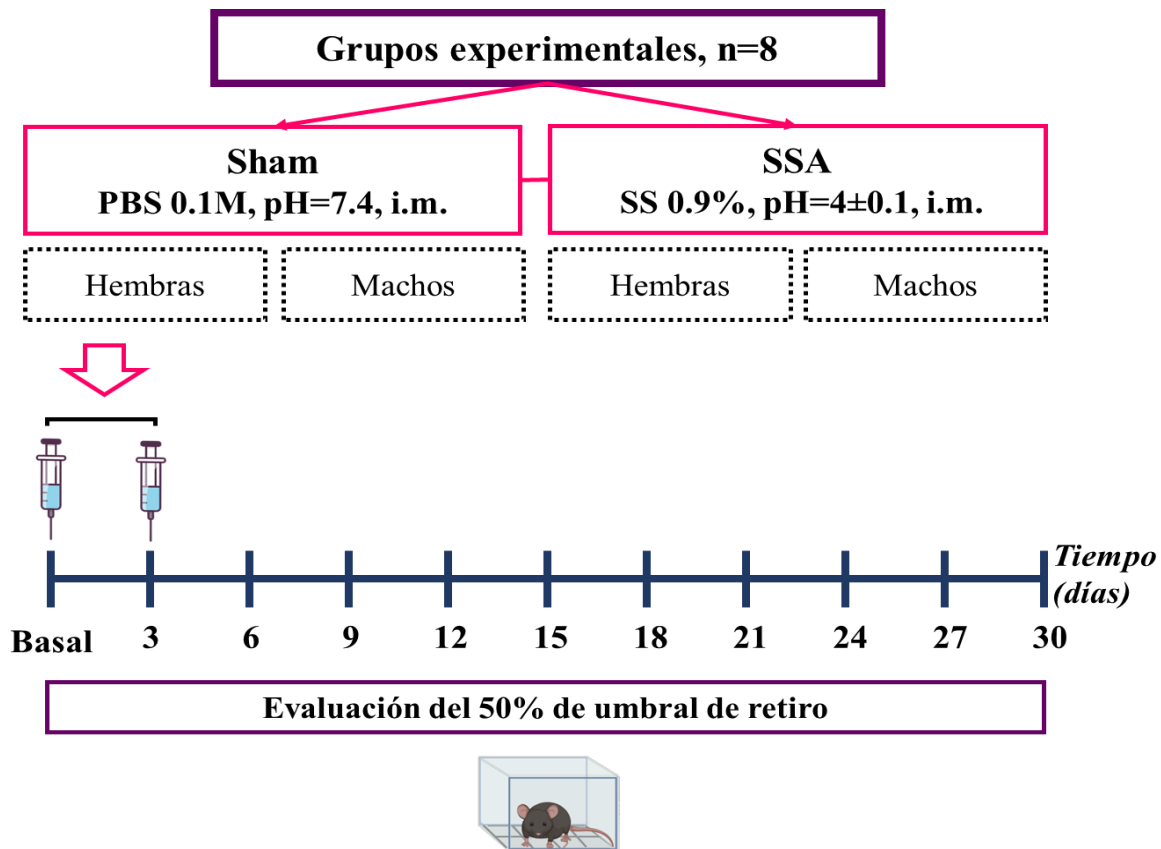


Figura 14. Diseño experimental para la caracterización del curso temporal del desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la administración de solución salina ácida.

Objetivo 2. Determinar a través del uso de glicirricina, el papel de la alarmina HMGB1 en la alodinia e hiperalgesia mecánica inducidas por la inyección intramuscular repetida de solución salina ácida.

Para cumplir con este objetivo se utilizaron 6 grupos experimentales que fueron evaluados el día 9 post-inyección que es el día cuando la alodinia mecánica ya está bien establecida en los animales administrados con SSA. En este día al grupo uno (G1), que fueron animales administrados con PBS se les administró por vía intratecal (i.t.) la dosis más alta empleada de glicirricina (2.5 µg/ratón) con el objetivo de identificar si este fármaco por sí mismo induce cambios en los valores del 50% de umbral de retiro. Simultáneamente, los grupos 2 al 6 (G2-6) fueron animales inducidos con SSA. El G2 se administró con el vehículo en el que se disolvió la glicirricina, mientras que los grupos 3 al 6 fueron administrados por vía i.t. con dosis crecientes de glicirricina, una dosis por grupo de la siguiente manera: G3: 0.0025, G4: 0.025, G5: 0.250 y G6: 2.5 µg/ratón. El día del experimento se inició con una

medición basal del 50% de umbral de retiro para corroborar que los animales presentaran alodinia (hora 0) y posterior a esta medición se realizó la administración del fármaco y se realizaron mediciones a las 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 6 horas (Figura 15). En estas condiciones, el incremento en el valor del 50% de umbral de retiro tras la administración de glicirricina se interpretó como un efecto antinociceptivo.

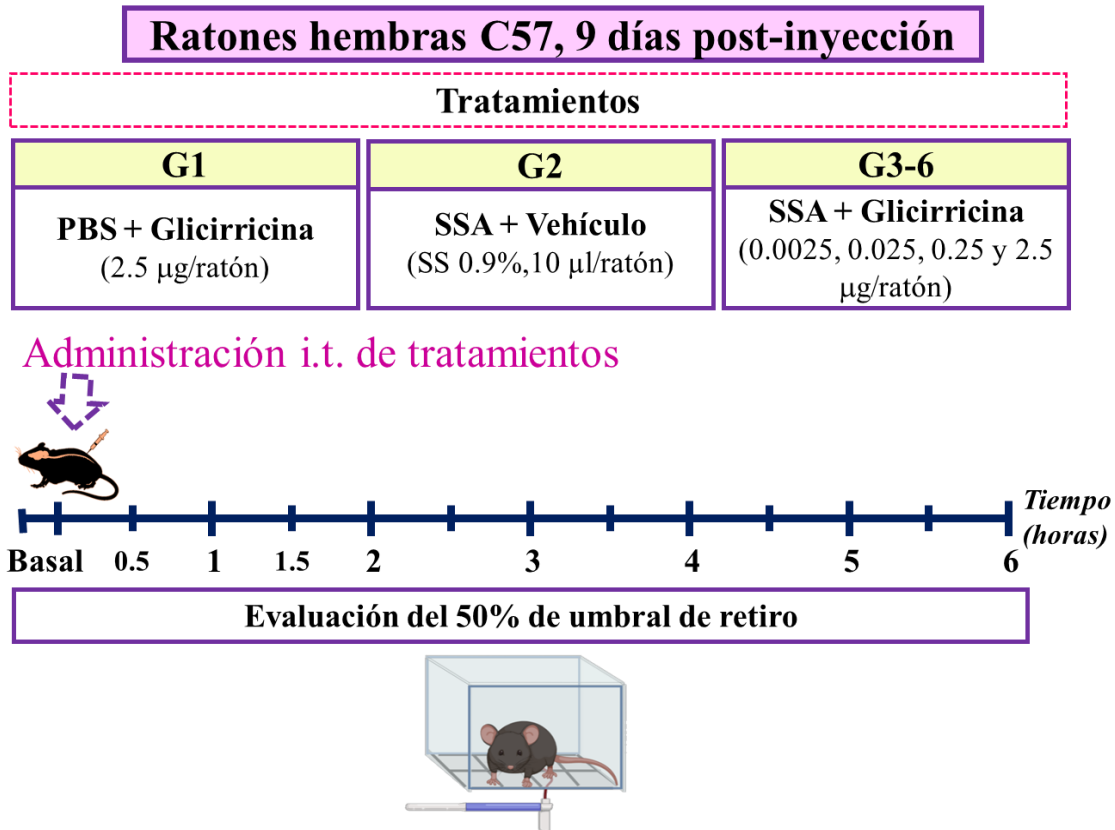


Figura 15. Diseño experimental para evaluar el efecto de glicirricina en la alodinia mecánica inducida por solución salina ácida.

Objetivo particular 3. Determinar, utilizando herramientas farmacológicas, si los efectos pronociceptivos de HMGB1, en el modelo de hipersensibilidad al dolor inducido por solución salina ácida están mediados por los receptores TLR-4, TLR-5, o RAGE.

Para lograr este objetivo, se evaluó el efecto de los diferentes antagonistas de los receptores más reportados de HMGB1 en la alodinia mecánica. La evaluación se realizó el día 9 post-inyección cuando la alodinia mecánica ya está establecida. De forma inicial se utilizaron 5 grupos experimentales inyectados con PBS en donde se evaluó la dosis máxima de cada

uno de los antagonistas, con la finalidad de verificar que los fármacos por sí solos no modifiquen los valores de 50% de umbral de retiro, es decir, que no produzcan dolor. Al G1 se le administró solución salina 0.9% (10 μ L/ratón, i.t.) que fue el vehículo utilizado para TLR4-IN-C34. El G2 se administró con dimetilsulfóxido al 1% en solución salina (10 μ L/ratón, i.t.) vehículo en el que se disolvió FPS-ZM1 y TH1020. Los grupos 3 a 5 fueron administrados por vía intratecal con TLR4-IN-C34 (4 ng/ratón); TH1020 (10 μ g/ratón) y FPS-ZM1 (2.5 ng/ratón) respectivamente (Figura 16).

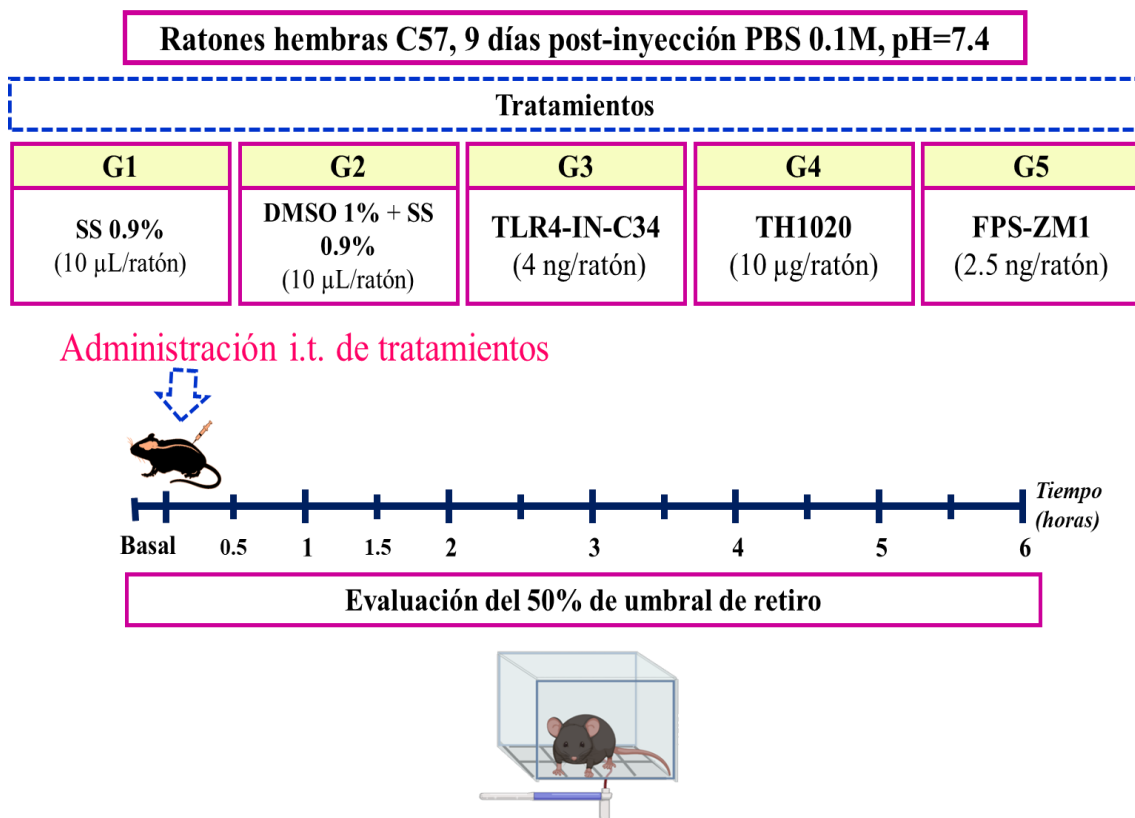


Figura 16. Diseño experimental para la evaluación de los vehículos y la dosis más alta de los antagonistas de los receptores TLR-4, RAGE y TLR-5 en ratones control inducidos con PBS.

Para determinar cuáles son los receptores por los que HMGB1 ejerce sus efectos pronociceptivos, se evaluó el efecto de la administración de diferentes antagonistas selectivos de los receptores de HMGB1 en ratones a los que se les indujo alodinia con SSA el día 9 post-inducción. Para esto se utilizaron 10 grupos experimentales los cuales fueron administrados de la siguiente manera, los grupos G1-4 recibieron el antagonista de TLR4-

IN-C34 a las dosis de 0.04, 0.4, 4 y 12.5 ng/ratón. Los grupos G5-7 recibieron el antagonista del receptor TLR-5 el compuesto TH1020 a las dosis de 1, 3 y 10 μ g/ratón; mientras que los grupos G8-10, fueron tratados con el antagonista RAGE, el FPS-ZM1 a las dosis de 1, 5 y 10 ng/ratón, todas las dosis fueron administradas por vía intratecal, posteriormente se realizó la medición del 50% de umbral de retiro de ambas patas traseras en los tiempos 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 6 horas post-administración (Figura 17).

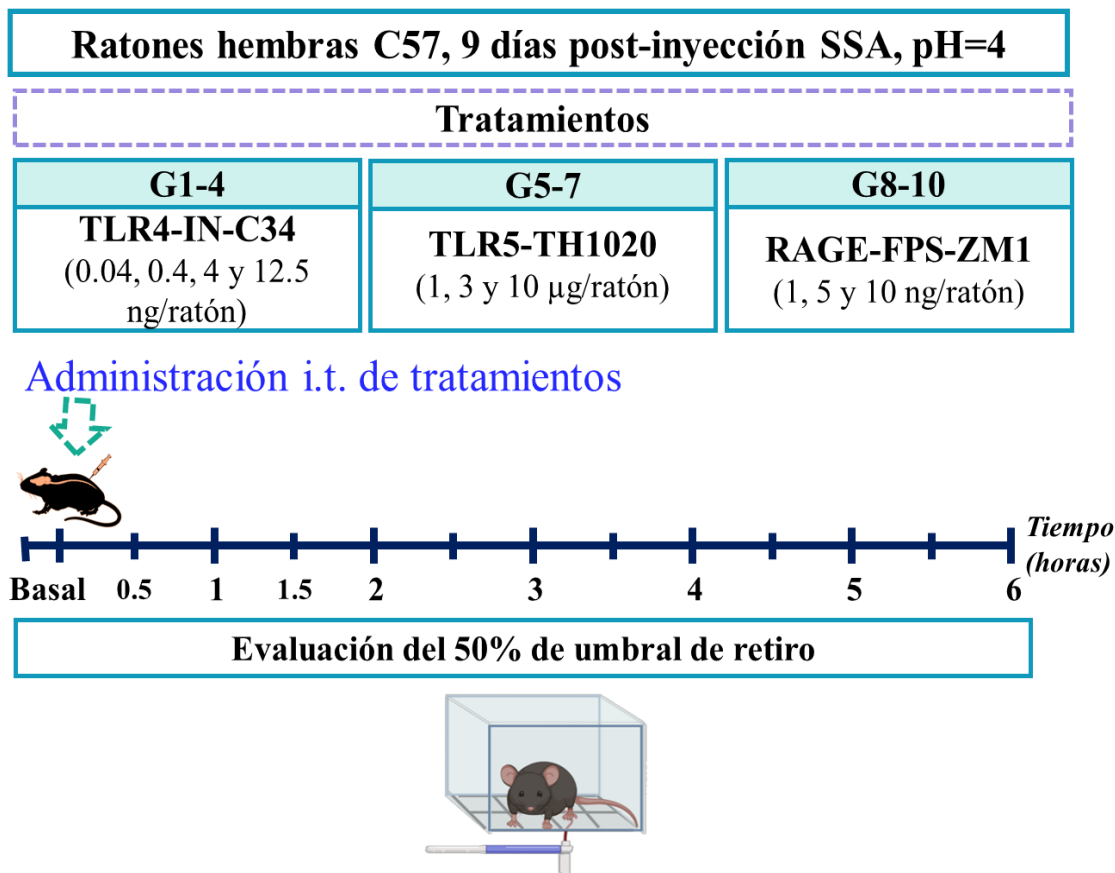


Figura 17. Diseño experimental para determinar farmacológicamente a través de que receptor HMGB1 ejerce sus efectos pronociceptivos.

7.6. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como el promedio de 6-8 animales \pm el error estándar de la media (SEM). Con los datos de 50% de umbral de retiro se construyeron los cursos temporales, a partir de los cuales se calculó el área bajo la curva (ABC) usando el método de los trapezoides. Para el análisis estadístico se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de Dunnett (gráficas de barras) y ANOVA de dos vías, de medias repetidas seguida de la prueba de Bonferroni, esto para comparar grupos con dos variables (dosis y tiempo). Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico Graph Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización del curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica inducida por la administración dual de SSA en ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6J

Para cumplir con los objetivos del presente proyecto, en primer lugar, se caracterizó el curso temporal del desarrollo de hipersensibilidad al dolor inducido por dos inyecciones de solución salina ácida (SSA) en ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6J. Adicionalmente, como control negativo, a otro grupo de ratones hembra o macho se les inyectó PBS 0.1 M, pH=7.4 siguiendo el mismo esquema de inyección que el de SSA a los cuales se les denominó sham. Observamos que el esquema de inyección de SSA en el músculo gastrocnemio izquierdo de ratones hembra produjo una disminución gradual y estadísticamente significativa del 50 % de umbral de retiro a partir del día 3 post-inyección, hasta alcanzar valores menores de 0.4 g el día 6 post-inducción. Este valor de 50% de umbral de retiro se mantuvo hasta el día 15 post-inducción e indican la presencia de alodinia mecánica, es decir, hipersensibilidad al dolor. A partir del día 18 los valores de 50% de umbral de retiro comenzaron a incrementar gradualmente hasta regresar a valores basales el día 30 post-inducción (Figura 18A). El desarrollo de alodinia mecánica inducido por SSA se observó tanto en la pata ipsilateral (IL) como en la contra lateral (CL), es decir, se produjo alodinia mecánica bilateral. En contraste con estos resultados, se observó que los ratones inyectados con PBS, no presentaron cambios significativos en los valores del 50% de umbral de retiro, en ninguna de las extremidades posteriores, durante todo el periodo de evaluación. Por otro lado, se observó que el desarrollo de alodinia mecánica en ratones macho mostró un curso temporal similar al observado en ratones hembra (Figura 18B). El análisis del área bajo la curva (ABC) mostró que la administración de SSA produjo una disminución estadísticamente significativa de este parámetro en la pata IL tanto de hembras como de machos en comparación con el ABC de la pata IL y CL de los ratones hembra y macho inyectados con PBS. Además, no se encontraron diferencias significativas entre el ABC de ratones hembra y macho (figura 18 C y D). Estos resultados en conjunto indican que la inyección de intramuscular repetida (2 inyecciones) de SSA en el músculo gastrocnemio izquierdo es la que produjo la alodinia mecánica bilateral y no la inyección por sí misma, tanto en hembras como en machos. Es importante mencionar que debido a

que la alodinia máxima se observó entre los días 6 a 15 post-inyección, las evaluaciones farmacológicas se realizaron el día 9 post-inyección cuando la alodinia está bien establecida y únicamente en ratones hembra.

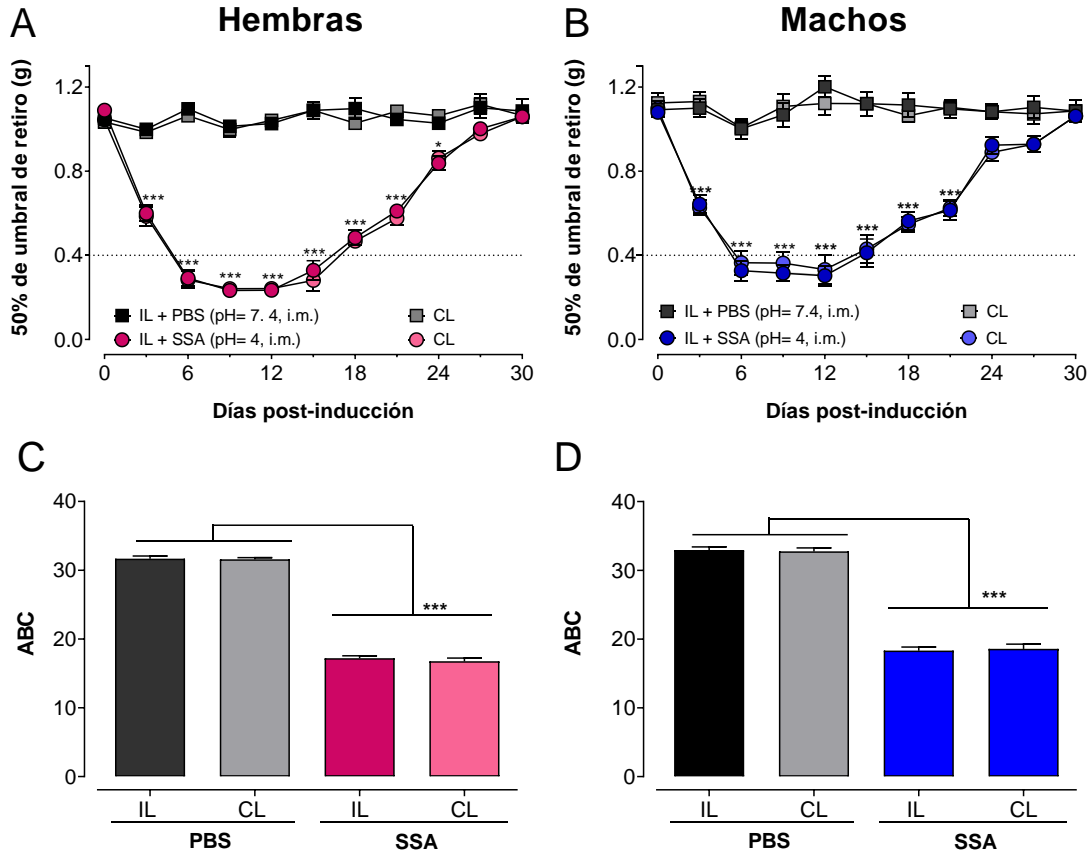


Figura 18. Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica inducido por la inyección repetida de solución salina ácida en músculo gastrocnemio de ratones hembra y macho. En A y B se muestran los cursos temporales del desarrollo de alodinia mecánica en la pata IL y CL en ratones hembra y machos, respectivamente. En C y D se muestra el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo inyectado con PBS por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (cursos temporales) o por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett (gráfica de barras), SSA: solución salina ácida; PBS: solución buffer de fosfato; IL: pata IL; CL: pata CL; i.m. intramuscular.

Posteriormente se realizó la validación del modelo de hipersensibilidad al dolor inducido por SSA mediante el uso de gabapentina y amitriptilina, fármacos estándar utilizados ampliamente en la clínica para el tratamiento del dolor crónico como es el caso de la fibromialgia. En la figura 19A, se muestra el efecto del tratamiento con una única dosis de gabapentina (100 mg/Kg, i.p.) en el 50% de umbral de retiro. Se observó que la administración de este fármaco antiepiléptico incrementó de forma estadísticamente significativa los valores de 50% de umbral de retiro a partir de los 30 min post administración y alcanzó su efecto máximo dos horas post-administración. A partir de este punto el efecto antialodínico disminuyó gradualmente hasta presentar valores de alodinia a las 5 horas post-administración, es decir la duración del efecto de este fármaco fue de 3 horas aproximadamente. El análisis de ABC mostró que la administración de gabapentina resultó en un incremento significativo del 46% en el grupo tratado con este fármaco en comparación con el grupo tratado con el vehículo. Este efecto se observó de forma bilateral, poniendo de manifiesto el efecto sistémico del fármaco (Figura 19B). De forma similar, se observó que el tratamiento intraperitoneal agudo con amitriptilina (30 mg/Kg), un antidepresivo tricíclico, incrementó gradual y significativamente los valores del 50% de umbral de retiro, observándose el efecto a partir de los 30 minutos post-administración y que se mantuvo hasta la hora 3 post-inyección. Sin embargo, los valores de 50% de umbral de retiro se mantuvieron por arriba de 0.8 g lo que indica que el efecto se mantuvo hasta por 5 horas (Figura 19C). Asimismo, en la gráfica del ABC se puede observar que la amitriptilina incrementó de forma estadísticamente significativa el ABC del grupo tratado en comparación del grupo que fue administrado con el vehículo. Cabe destacar que la amitriptilina incrementó el ABC del grupo tratado a valores similares a los observados en el grupo administrado con PBS (Figura 19 D).

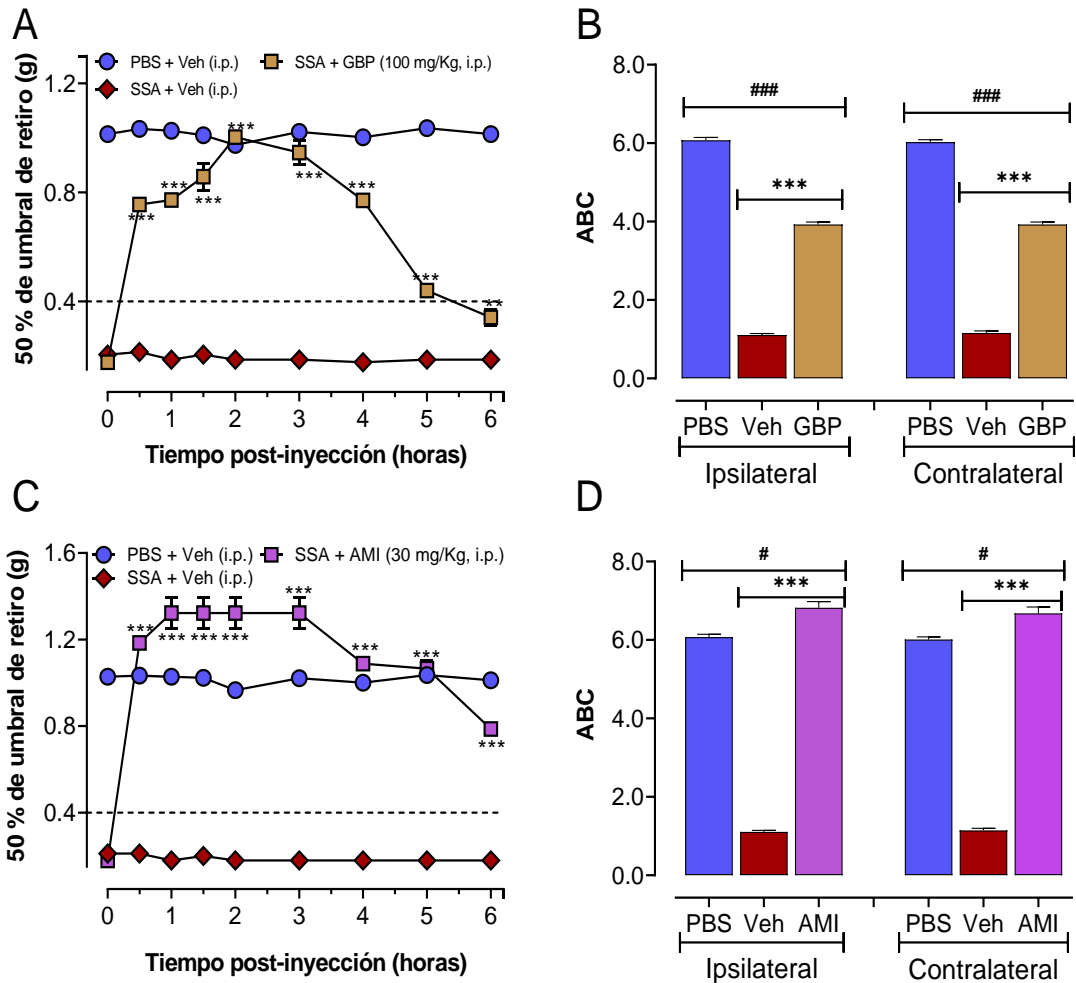


Figura 19. Efecto del tratamiento agudo con gabapentina y amitriptilina en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida. A y C muestran los cursos temporales del efecto antialodínico de gabapentina y amitriptilina. B y D muestran el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales. Cada punto representa el promedio de 7-8 animales \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo SSA + Veh por ANOVA de dos vías seguida de la prueba Bonferroni (cursos temporales), # $P < 0.1$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ con respecto al grupo de PBS, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo tratado con Veh por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (gráfica de barras). AMI: amitriptilina, GBP: Gabapentina, SSA: solución salina ácida.

8.2. Estandarización de la administración de fármacos por vía intratecal

La vía de administración intratecal (i.t.), fue elegida para este trabajo ya que permite la introducción directa de fármacos a nivel de la médula espinal, sitio importante en el procesamiento del dolor. Para la estandarización del modelo se utilizaron como controles positivos los fármacos lidocaína al 2% (10 μ L/ratón, i.t.) y morfina (1 mg/ml, 10 μ L/ratón, i.t) cuyos resultados se observan en la figura 20. El efecto de la administración intratecal en ratones hembra con dolor neuropático inducido por axotomía parcial del nervio ciático evaluado el día 23 post-cirugía; así como en ratones hembra C57, con alodinia mecánica inducido por la inyección de solución salina ácida al día 9 post-inducción, se observó el incremento del 50% de umbral de retiro a partir de los primeros 30 minutos posterior a la administración, la duración del efecto tuvo una duración de 2 horas en los grupos administrados con lidocaína (Figura 20 A y C) y 3 horas en los administrados con morfina en ambos modelos de dolor crónico (Figura 20 B y D) (4). Cabe destacar que la producción de un reflejo de movimiento de retirada de la cola se utilizó para verificar que la administración se realizó en el sitio correcto.

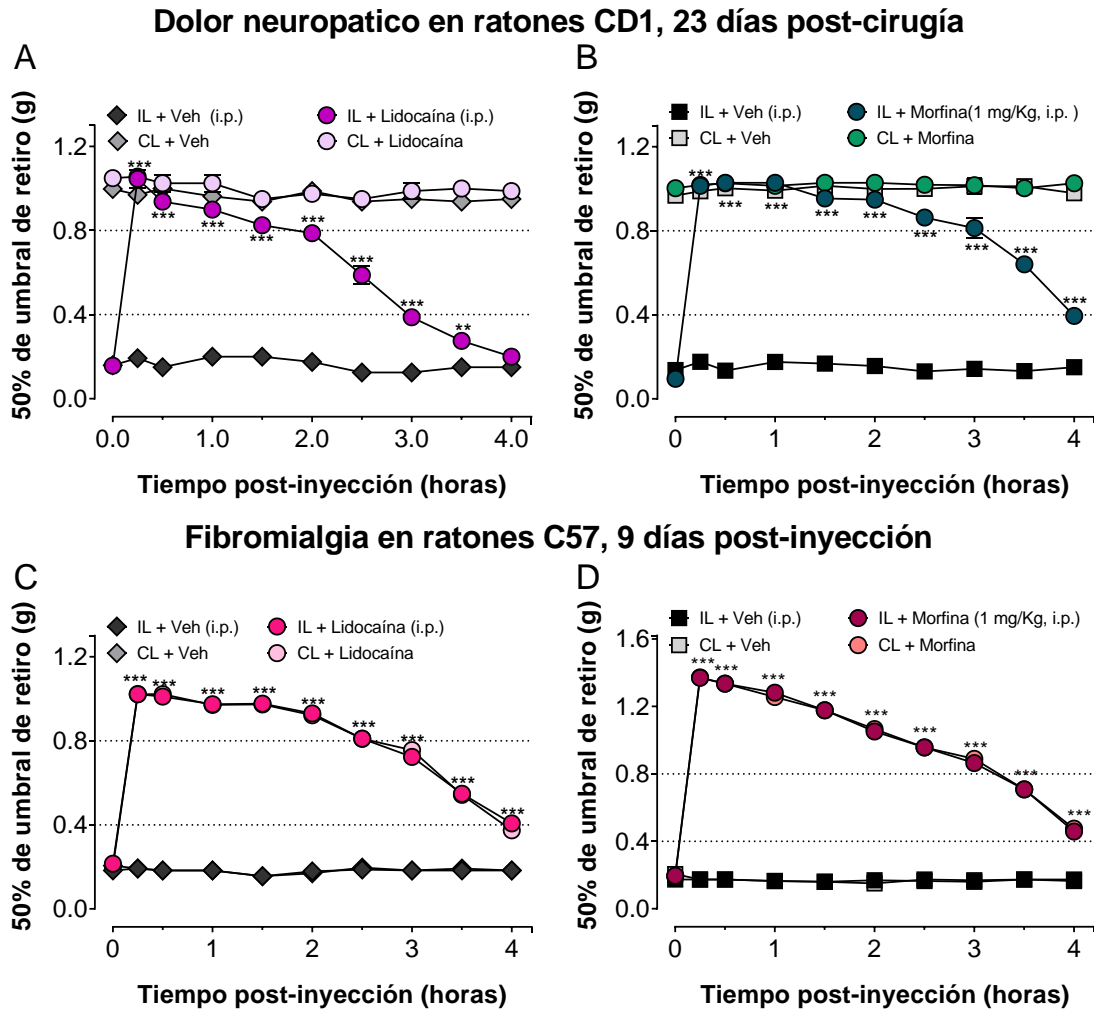


Figura 20. Efecto antialodínico de lidocaína y morfina administradas por vía intratecal en dos modelos de dolor crónico. A y B, cursos temporales del efecto antialodínico de la lidocaína y morfina en un modelo de dolor neuropático. C y D, cursos temporales del efecto antialodínico de lidocaína morfina en un modelo de fibromialgia experimental. Cada punto representa un promedio de 8 animales \pm SEM. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo inyectado con vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. IL: pata IL; CL: pata CL.

8.3. Efecto del inhibidor de HMGB1 glicirricina en la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA

Con la finalidad de determinar que los diferentes fármacos por sí mismos no producen dolor, se evaluó el efecto de la dosis máxima de glicirricina y su vehículo (solución salina fisiológica 0.9%) en ratones sham el día 9 post-inducción, es decir cuando los ratones inyectados con SSA presentaron alodinia marcada. Los ratones denominados sham fueron ratones administrados con PBS en el músculo gastrocnemio izquierdo siguiendo el mismo esquema de administración que el de la solución salina ácida. Se observó que la glicirricina (2.5 µg/ratón, i.t.) o el vehículo no produjo cambios significativos en los valores del 50% de umbral de retiro en los tiempos evaluados mostrando que la glicirricina o la inyección intratecal no producen dolor por sí mismas (Figura 21A). Por otro lado, el efecto de la administración de dosis crecientes de glicirricina (0.0025-2.5 µg/ratón), un inhibidor de HMGB1 de origen natural se observa en la figura 21B. Los resultados mostraron que la glicirricina produjo un incremento del 50% de umbral de retiro a partir de las 0.5 h después de la administración alcanzando un efecto máximo a partir de este tiempo y hasta 1.5 h después de la administración. Posteriormente, los valores de 50% de umbral de retiro descendieron gradualmente hasta alcanzar valores menores a 0.4g entre las horas 5 y 6. El efecto antialodínico de la glicirricina se observó tanto en la pata ipsilateral como contralateral. El análisis de área bajo la curva (ABC) mostró que la glicirricina administrada por vía intratecal incremento el ABC en comparación con el ABC del grupo SSA de forma dependiente de la dosis y bilateral, siendo este efecto estadísticamente significativo en todas las dosis evaluadas. El efecto antialodínico máximo se observó con la dosis de 2.5 µg/ratón (Figura 21 C y D). Estos resultados sugieren que HMGB1 participa en el mantenimiento de la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA.

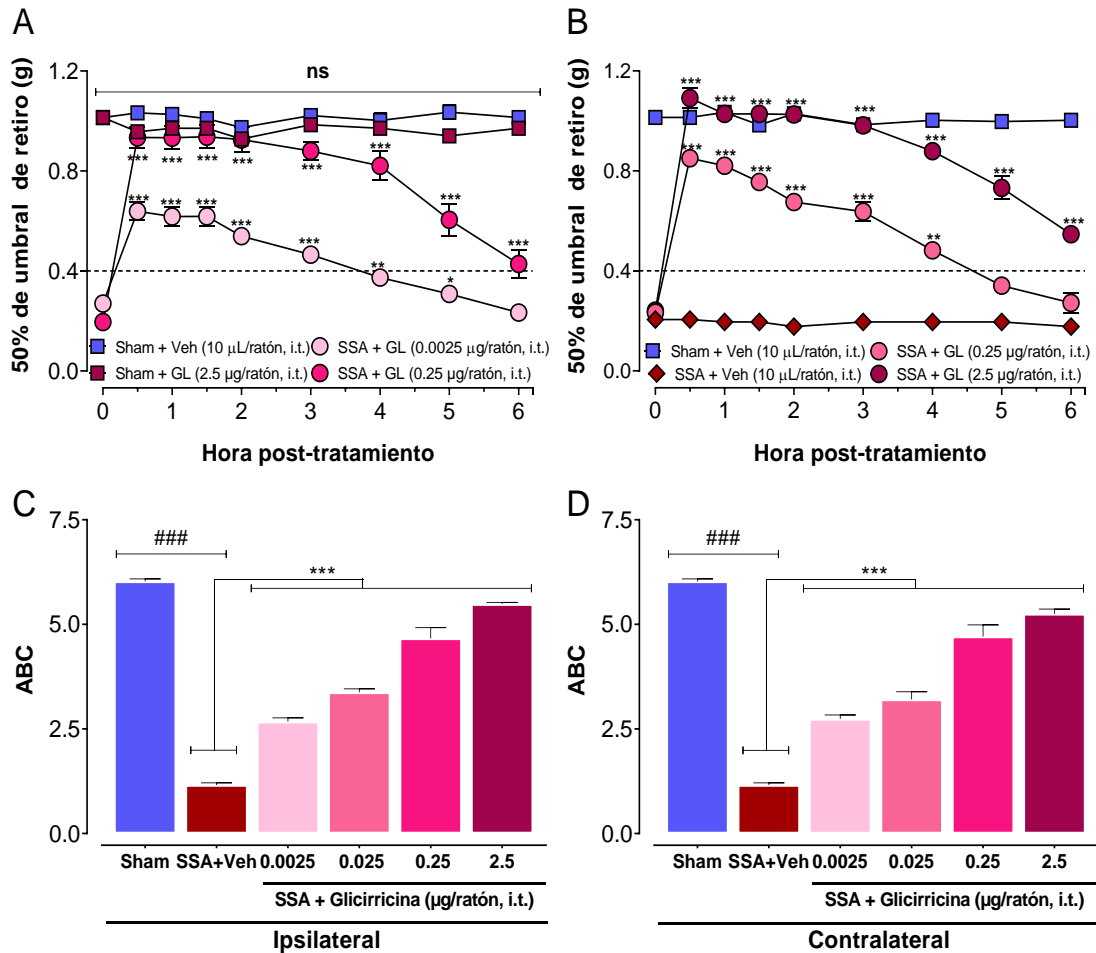


Figura 21. Efecto de la glicirricina (i.t.) sobre la alodinia mecánica inducido por solución salina ácida (SSA). En A y B se muestra el efecto de dosis crecientes de glicirricina sobre la alodinia mecánica en la pata IL de ratones con alodinia inducida por SSA o sham. C y D área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales del 50% de umbral de retiro de la pata ipsilateral y contralateral. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ con respecto al grupo SSA por ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni (curso temporal). ### $P < 0.001$ con respecto al grupo Sham, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo tratado con SSA+Veh por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett (gráfica de barra). i.t.: intratecal.

8.4. Efecto de la administración intratecal del antagonista del receptor TLR-4 IN-C34 la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA

La vía de señalización mediada por HMGB1 y el receptor TLR-4 ha sido descrita en diversos modelos preclínicos que cursan con dolor crónico. Sin embargo, aún no se ha estudiado si el impedir la activación de este receptor tiene efectos benéficos en el dolor crónico inducido por SSA. Por tal motivo en el presente trabajo se evaluó el efecto del antagonista selectivo del receptor TLR-4, el compuesto IN-C34. De forma inicial se evaluó la dosis de 4 ng/ratón y su vehículo, en ratones sham el día 9 posterior a la inducción del modelo. En la figura 22A, se observa que ni la administración del antagonista específico del receptor TLR-4 o su vehículo indujo cambios en el 50% de umbral de retiro en ninguno de los tiempos evaluados en ratones sham. Por otro lado, el tratamiento con dosis crecientes administradas a nivel intratecal de TLR-4-IN-C34 en la alodinia mecánica inducida por SSA, incrementó de manera significativa el 50% de umbral de retiro 0.5 h después de administración, punto en donde se observó el efecto antialodínico máximo (valores \geq a 0.8 g de 50% umbral de retiro). Este efecto se mantuvo la hora 3 post-inyección del tratamiento. A partir de este tiempo, los valores de 50% de umbral de retiro de la pata disminuyeron hasta alcanzar valores menores a 0.4 g entre la hora 5 y 6 post-administración (figura 22 A, B). En la figura 22 C y D, se muestra que el uso de TLR-4-IN-C34 incrementó de forma significativa el ABC a las dosis de 0.04, 0.4, 4 y 12.5 ng/ratón en comparación del grupo SSA+Veh, destacando que el efecto antialodínico máximo se presentó con la dosis de 12.5 ng/ratón. Estos resultados en conjunto muestran que TLR-4-IN-C34 posee efecto antialodínico bilateral en el modelo de hipersensibilidad al dolor inducido por SSA.

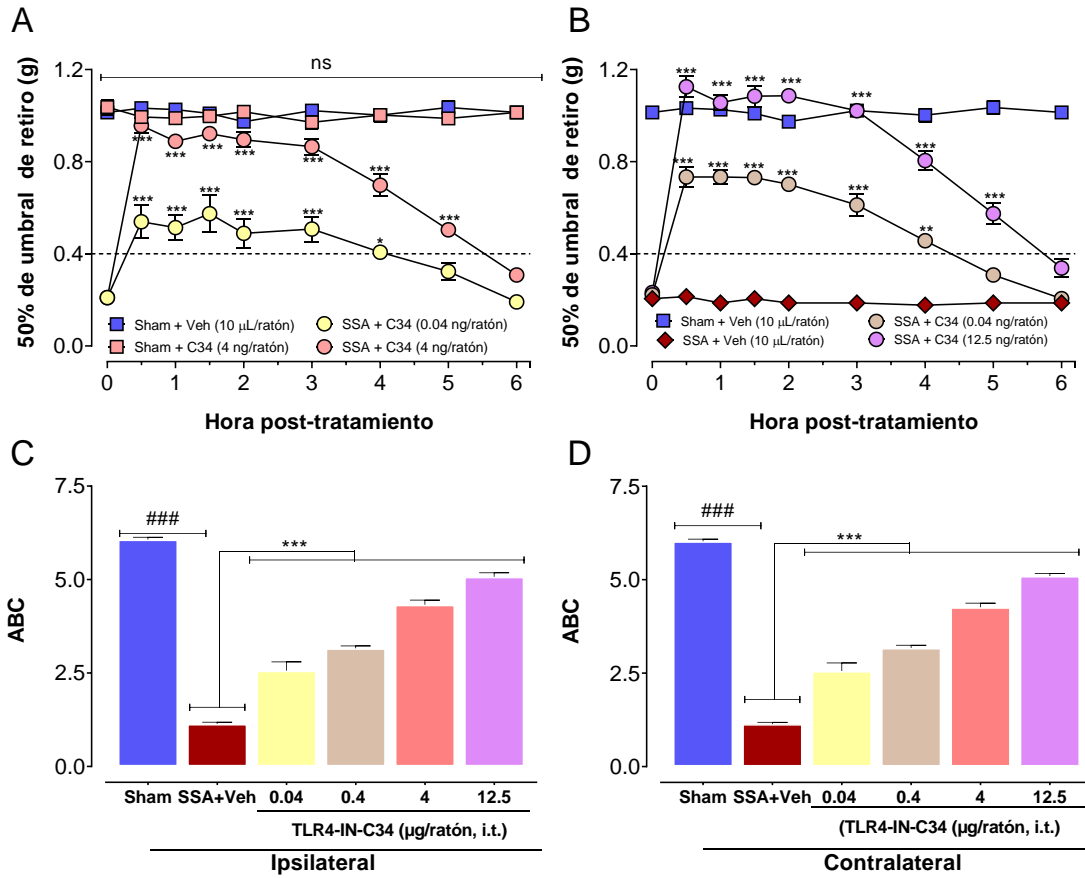


Figura 22. Efecto del tratamiento intratecal con el antagonista del receptor TLR-4 IN-C34 en la alodinia mecánica inducida por SSA. En A y B se muestra el efecto de dosis crecientes de IN-C34 sobre la alodinia mecánica en la pata IL de ratones con alodinia inducida por SSA o sham. En C y D, se muestra el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales de la pata ipsilateral y contralateral. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * P <0.1, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al grupo SSA+Veh por ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni (curso temporal), ### P <0.001 con respecto al grupo Sham. *** P <0.001 con respecto al grupo tratado con SSA+Veh por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (grafica de barras). i.t.: intratecal.

8.5. Efecto del antagonista del receptor TLR-5 TH1020 en la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA

Para determinar la posible participación del receptor TLR-5 en el dolor producido por la administración con SSA se evaluó el efecto del tratamiento con el antagonista selectivo de TLR-5, el compuesto TH1020 a la dosis de 10 µg/ratón y de su vehículo en ratones sham el día 9 posterior a la inducción del modelo. En la figura 23A, se muestra que la administración del compuesto TH1020 disminuyó el 50% de umbral de retiro a valores cercanos a 0.8 g en la primera hora tras su administración. Sin embargo, este parámetro regresó a valores basales a la hora 2 post-administración. En contraste el vehículo, no modificó los valores de este parámetro en ninguno de los tiempos evaluados. En la figura 23 C y D, se muestran los cursos temporales del efecto del tratamiento con las dosis 1, 3 y 10 µg/ratón, i.t., del compuesto TH1020 en ratones con alodinia mecánica inducida por SSA. Se observó que el tratamiento con TH1020 produjo un incremento en los valores del 50% de umbral de retiro desde los 30 minutos. Este efecto se mantuvo hasta por 4 horas, posteriormente, se revirtió por completo a la hora 6 post-administración. En el ABC, se observó que el tratamiento con TH1020 a las dosis evaluadas posee efecto antialodínico dependiente de la dosis y estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con el vehículo a todas las dosis evaluadas. Este efecto se observó en ambas patas traseras. Estos resultados muestran que el receptor TLR-5 participa en el mantenimiento de la hipersensibilidad inducida por SSA.

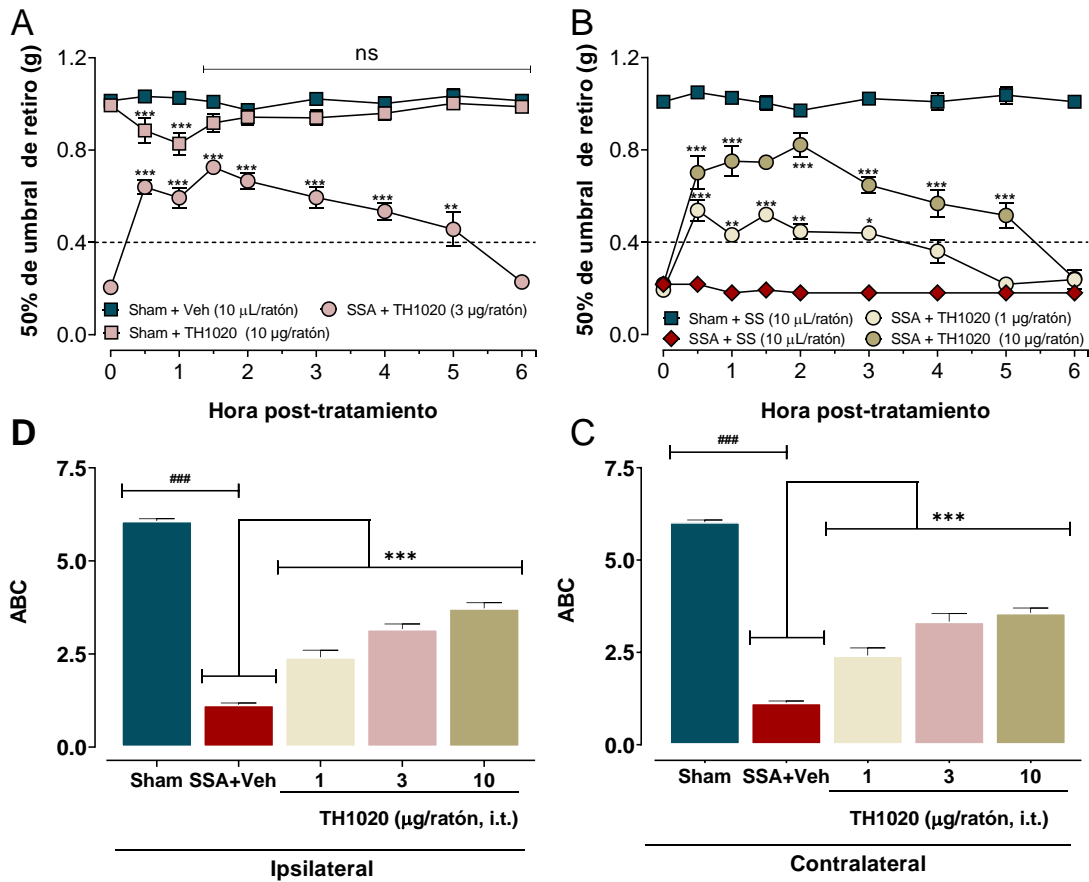


Figura 23. Efecto del tratamiento intratecal con el antagonista del receptor TLR-5 TH1020 (i.t.) en la alodinia mecánica inducida por solución salina ácida. En A y B se muestra el efecto de dosis crecientes de TH1020 sobre la alodinia mecánica en la pata ipsilateral de ratones con alodinia inducida por SSA o sham. En C y D, se muestra el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales de la pata ipsilateral y contralateral. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * P <0.1, ** P <0.01, *** P <0.001 con respecto al grupo SSA + Veh por ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni (curso temporal), ### P <0.001 con respecto al grupo Sham. *** P <0.001 con respecto al grupo tratado con SSA+ Veh por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett (grafica de barras). i.t.: intratecal.

8.6. Efecto de la administración del antagonista del receptor RAGE en la hipersensibilidad al dolor inducido por solución salina ácida

Para determinar la participación del receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) en la hipersensibilidad inducida por SSA se utilizó el antagonista específico del receptor RAGE, el compuesto FPS-ZM1. Primero se evaluó el efecto de la dosis de 10 ng/ratón, i.t. en ratones sham. Los resultados obtenidos muestran que el 50% de umbral de retiro de los animales sham administrados con esta dosis presenta valores mayores a 0.8 g y este valor no cambia en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 24A). En la figura A y B se muestran los cursos temporales del efecto del antagonista FPS-ZM1 en la alodinia mecánica a las dosis de 1, 5 y 10 ng/ratón, i.t., en ratones con alodinia inducida con SSA el día 9 post-inducción. Se observa que todas las dosis evaluadas de FPS-ZM1 revirtieron la alodinia mecánica inducida por SSA. El efecto antialodínico máximo se observó en los primeros 30 minutos tras la administración y este efecto se mantuvo hasta por cuatro horas. A partir de este momento, los valores de 50% de umbral de retiro disminuyeron gradualmente hasta alcanzar valores de alodinia a la hora seis post-administración. Mientras que el ABC, mostró que todas las dosis evaluadas de FPS-ZM1 incrementaron de manera estadísticamente significativa y dependiente de la dosis este parámetro en contraste con SSA Tabla 5+ vehículo, el efecto antialodínico fue estadísticamente significativo a partir de la dosis de 1 ng/ratón y el efecto máximo se logró a la dosis de 10 ng/ratón, siendo una respuesta bilateral como se muestra en la figura 24 C y D.

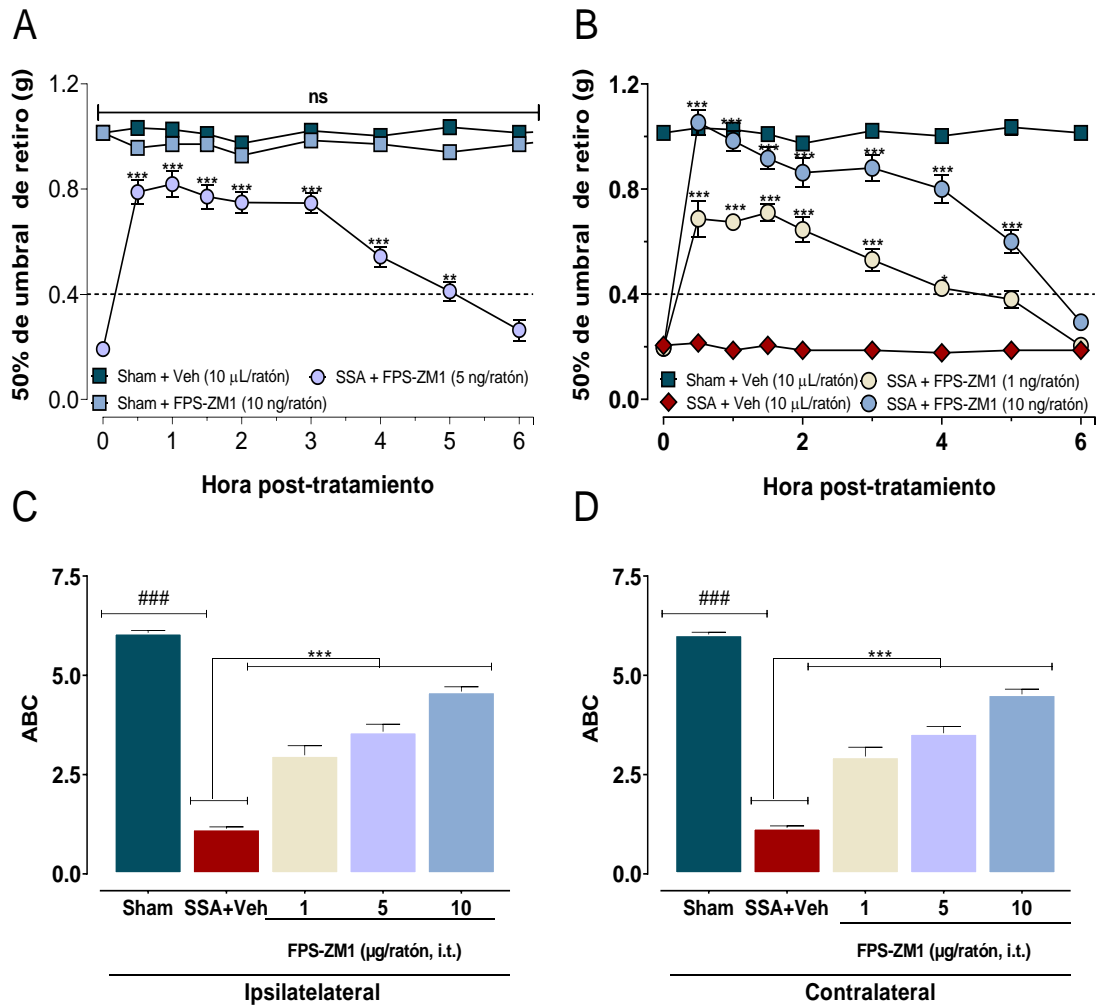


Figura 24. Efecto de FPS-ZM1 (i.t.) antagonista del receptor RAGE en la alodinia mecánica inducido por solución salina ácida. En A y B se muestra el efecto de dosis crecientes de FPS-ZM1 sobre la alodinia mecánica en la pata ipsilateral de ratones con alodinia inducida por SSA o sham. En C y D, se muestra el área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales de la pata ipsilateral y contralateral. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm SEM. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al grupo SSA + Veh por ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni (curso temporal), ### $P < 0.001$ con respecto al grupo Sham. *** $P < 0.001$ con respecto al grupo tratado con SSA + Veh por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (grafica de barras). i.t.: intratecal.

9. DISCUSIÓN

9.1. Caracterización del modelo inducido por solución salina ácida

En el presente trabajo se determinó la participación de la alarmina HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por solución salina ácida, así como de los receptores TLR-4, TLR-5 y RAGE con la finalidad de conocer mejor los mecanismos que participan en el desarrollo y el mantenimiento del dolor crónico. El modelo de hipersensibilidad al dolor inducido por la inyección repetida de solución salina ácida en musculo gastrocnemio de la rata o el ratón es considerado un modelo de fibromialgia experimental (162). La fibromialgia es un síndrome de dolor crónico primario altamente debilitante, en donde el dolor crónico se considera la enfermedad por sí mismo (35).

El dolor crónico es un problema de salud complejo que tiene un impacto negativo en la persona que lo padece y en los sistemas de salud. Actualmente es una de las principales causas de sufrimiento en todo el mundo y una carga económica sustancial para la sociedad. Aunque el sufrimiento no puede cuantificarse, la carga económica que representa es grande. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América se estima que es de aproximadamente \$ 650 mil millones de dólares por año, como resultado de los gastos en atención médica, así como debido a la pérdida de productividad de las personas afectadas (163, 164). El dolor crónico resulta de una enfermedad o una lesión; sin embargo, no sólo es un síntoma acompañante, sino también una condición patológica separada por derecho propio, con su propia definición médica y taxonomía como es el caso del dolor crónico primario que se observa en los pacientes con fibromialgia.

La fibromialgia esta categorizada como un síndrome de dolor crónico primario, y afecta a millones de personas a nivel mundial. Se define como síndrome de dolor crónico musculoesquelético generalizado que está presente en al menos 4 de 5 regiones corporales, que perdura por al menos 3 meses (165). Los pacientes con fibromialgia, además de dolor generalizado, experimentan fatiga constantemente, trastornos del sueño, trastornos cognitivos y una gran variedad de síntomas somáticos. Todo lo anterior frecuentemente coexisten con ansiedad y depresión (40). El dolor generalizado y crónico es el síntoma más debilitante y en conjunto con los diversos síntomas, que varían en severidad, resultan en

una pobre calidad de vida de la persona afectada. En esta patología es difícil identificar la causa del dolor, sin embargo, está bien establecido que existe hipersensibilidad del sistema nervioso que se manifiesta con el desarrollo de alodinia mecánica e hiperalgesia muscular. En este proyecto se utilizó un modelo de fibromialgia experimental inducido por la administración de solución salina ácida (pH=4) en el músculo gastrocnemio izquierdo del ratón de la cepa C57 (166). En nuestras condiciones experimentales la inyección de solución salina los días 0 y 2 después de la primera inyección produjo hiperalgesia el día 3 post inyección, sin embargo, a partir del día 6 y hasta el día 15 se observó alodinia mecánica marcada tanto en la pata ipsilateral como contralateral. Posteriormente, la hipersensibilidad empieza a revertirse hasta alcanzar valores de 50% de umbral de retiro normales 4 semanas post-inyección. Cabe destacar que el desarrollo de alodinia mecánica mostró el mismo curso temporal tanto en hembras como en machos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la administración de SSA induce hipersensibilidad al dolor que se manifiesta como una disminución del umbral de retiro a los estímulos mecánicos. Este hallazgo es congruente con resultados previos de nuestro laboratorio utilizando ratones de la cepa CD1 (160), y con varios estudios ya publicados que han reportado que la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA perdura entre 12 y 28 días (161, 162, 166) y dado a que no se observaron diferencias entre machos y hembras no es dependiente del sexo del roedor (167).

Hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos de cómo la inyección de SSA en el músculo gastrocnemio produce dolor. La hipótesis más aceptada es que se produce *priming* de los nociceptores, lo que sugiere que la transición de dolor agudo a crónico podría involucrar la plasticidad neural de las fibras aferentes primarias. En este contexto, la estimulación nociva aguda (primera inyección de SSA) puede desencadenar hipersensibilidad duradera de los nociceptores a estímulos nocivos posteriores (segunda inyección) (168). Lo anterior aunado a evidencias que sugieren que la acidosis tisular puede causar dolor muscular, como en el caso de la acidez tisular observada en patologías como la artritis. En este modelo se ha comprobado que la acidez de la solución salina durante la primera inyección produce la activación y sensibilización de los nociceptores que inervan el músculo gastrocnemio, mientras que la segunda inyección favorece el desarrollo de alodinia de larga duración. Cabe destacar que, aunque las dos inyecciones se producen en el mismo sitio, se produce la alodinia bilateral, es decir, dolor crónico generalizado,

característica principal de la fibromialgia, lo que sugiere el desarrollo de sensibilización central. Otras características importantes de la fibromialgia son que 1) es difícil identificar la causa subyacente y 2) no se asocia con inflamación. Por tal motivo, en un estudio realizado por Sluka y colaboradores se determinó mediante histología si la inyección intramuscular producía un daño tisular en el sitio de la inyección. Los resultados mostraron que en la mayoría de los animales (8/12) no se observó daño tisular o inflamación aparente después de la primera o segunda inyección. Mientras que en 4 se produjo daño tisular moderado debido a la administración que se revirtió 24 h después de la segunda inyección. En el mismo trabajo también se estudió si la inyección de SSA producía acidosis tisular y activación de los nociceptores en el sitio de la inyección. Se encontró que la inyección de SSA pH=4 produjo una disminución del pH intramuscular de 7.4 a 6.5 en los primeros tres minutos, sin embargo, la acidez se revirtió después de 7 minutos. Asimismo se observó la activación de aproximadamente el 50% de los nociceptores que inervan el músculo (162). Por otro lado, existe evidencia que muestra que los mecanismos involucrados en el desarrollo de dolor generalizado inducido por acidosis incluyen la activación de los canales ASIC3 y TRPV1 los cuáles son los principales sensores de protones en los nociceptores, así como la hiperactivación de los canales de sodio Nav 1.8 que se expresan en nociceptores musculares que expresan isolectina B4, es decir en nociceptores no peptidérgicos. Lo anterior se evidenció bloqueando estos canales con antagonistas selectivos después de la primera inyección de SSA lo que impidió el desarrollo de hipersensibilidad al dolor de larga duración (166). Otro mediador que participa en el desarrollo de dolor generalizado es condiciones no inflamatorias es la SP. En este sentido existe evidencia que muestra que la acidosis del tejido induce la liberación de SP de los nervios vecinos. La SP posteriormente activa a su receptor NK1 lo que lleva a la activación de tirosinas cinasas y canales de potasio dependientes de voltaje particularmente el Kv7 (169). Por otro lado, la hipersensibilidad generalizada sugiere la presencia de sensibilización central, que puede estar asociada a cambios moleculares a nivel espinal y supraespinal, como por ejemplo el incremento de la expresión de los canales ASIC3, Nav1.7 y Nav1.8 a nivel de DRG, ME y el tálamo todos sitios importantes de la vía de transmisión del dolor (167, 170). Cabe destacar que la hipersensibilidad una vez desarrollada puede revertirse parcialmente bloqueando la excitabilidad de neuronas espinales o supraespinal a través del bloqueo de la

neurotransmisión glutamatérgica, dado que los niveles de este neurotransmisor se encuentran incrementados tras la segunda inyección de SSA (171). Esta información es congruente con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en donde la administración de gabapentina que se caracteriza por ejercer sus efectos sobre la subunidad $\alpha 2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje y la amitriptilina que bloque la recaptura de los neurotransmisores serotonina y noradrenalina permitiendo el aumento de estos neurotransmisores en el espacio presináptico y de esta manera aumentar la transmisión serotoninérgica y noradrenérgica y la apertura de canales de potasio (172), y la morfina, un agonista de los receptores opioides μ (173) revierten la alodinia mecánica inducida por SSA.

9.2. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de glicirricina

HMGB1 es una proteína altamente conservada que desempeña un papel crítico en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos (90). Además, tiene la capacidad de viajar del núcleo al citoplasma, y desde el citoplasma puede ser movilizada al espacio extracelular (91). Según su localización en los diferentes compartimentos celulares HMGB1 desempeña funciones biológicas específicas. A nivel extracelular, actúa como un DAMP a través de su unión con una variedad de receptores e induciendo el reclutamiento y activación de células cebadas, macrófagos y otras células productoras de mediadores inflamatorios con la finalidad de modular, regular y reparar las células dañadas (88). Hasta el momento hemos mostrado que existen una amplia variedad de estudios preclínicos de dolor agudo y crónico que evidencian la participación de la alarmina HMGB1 como un importante mediador del dolor agudo (125, 127) pero también en el dolor crónico particularmente en del tipo neuropático (129, 143, 148). De hecho, la administración HMGB1 recombinante a lo largo de la vía nociceptiva desde la periferia hasta el sistema nervioso central produce dolor. En estudios *in vivo* de dolor agudo de tipo inflamatorio, la administración exógena de HMGB1 por vía intraplantar en rata (10 y 20 $\mu\text{g/pata}$) (129, 130) o ratón (1-1000 ng/pata) (131, 132) produjo hipersensibilidad mecánica que se acompaña con una disminución de la latencia de respuesta a estímulos térmicos y edema de la pata inyectada, a nivel peri-ciático la alodinia que se presenta es unilateral a dosis bajas y bilateral a dosis altas y perdura al menos 72 horas (106, 125), mientras que la administración sistémica a dosis subefectivas

de HMGB1 en combinación con una dosis subaguda de ciclofosfamida inducen alodinia abdominal referida (133), finalmente a nivel intratecal produce alodinia mecánica (128). Los efectos pronociceptivos de HMGB1 dependen de su estado de oxido-reducción. Tanto la isoforma $_{all}$ HMGB1 como la forma HMGB1 disulfuro producen dolor, sin embargo, la isoforma disulfuro es la más potente en generar estos efectos (131, 132).

En este estudio, investigamos la participación de HMGB1 en la hipersensibilidad al dolor inducida por la administración de SSA, utilizando como estrategia farmacológica la administración intratecal de glicirricina, un triterpeno de origen natural que se une directamente a la alarmina HMGB1 impidiendo sus efectos extracelulares y que ha sido utilizado ampliamente en diferentes modelos de dolor para estudiar las funciones de HMGB1 (174). Nuestros resultados muestran que la administración intratecal de dosis crecientes de glicirricina revirtió significativamente y de manera dependiente de la dosis la alodinia mecánica inducida por SSA, lo que sugiere que la alarmina HMGB1 a nivel central desempeña un rol importante en la hipersensibilidad al dolor inducida por la administración intramuscular de SSA (Figura 20). Este es el primer estudio que evalúa la participación de HMGB1 en un modelo de fibromialgia experimental inducido por administración intramuscular de SSA por lo que no hay estudios directos con los cuales comparar. No obstante, en un modelo de fibromialgia experimental inducido por restricción crónica del movimiento en ratas (datos no publicados) también se observó que la administración intratecal de glicirricina (dosis, i.t.) produjo efecto antialodínico (175). Estos resultados son congruentes con los resultados estudios en donde se utilizó un modelo de dolor inflamatorio inducido por la inyección intraplantar de CFA en ratón. En estas condiciones se observó que el tratamiento con glicirricina (4 mg/mL, i.p.) presentó un efecto antialodínico significativo (156, 157). En otro modelo de dolor inflamatorio, en este caso un modelo de dolor inducido por cistitis, la administración sistémica de glicirricina también disminuyó la alodinia abdominal referida (176). Por otro lado, en modelo de dolor crónico inducido por lesión del nervio tibial en rata (137) y en un modelo de neuropatía en rata espontáneamente diabética (150) se observó que el post-tratamiento intraperitoneal repetido con glicirricina revirtió la alodinia inducida por lesión nerviosa. Si bien en este proyecto no se estudió la expresión de HMGB1 en la médula espinal, sitio en donde fue administrada la glicirricina, existe evidencia que demuestra que la expresión de la proteína o el ARNm incrementa en

este sitio como consecuencia de la aplicación de estímulos nocivos que producen dolor, tal es el caso de la lesión de los nervios espinales por lesión quirúrgica (146), la lesión nerviosa por hiperglucemia como es el caso de la neuropatía diabética (148, 151) o bien estímulos químicos irritantes como el CFA (156). Con base en estas evidencias es posible suponer, que la acidez de la solución salina favorece un incremento de la expresión de HMGB1 en la médula espinal y que el efecto antialodínico de glicirricina se debe al bloqueo de las acciones de HMGB1 a este nivel. Desde un punto de vista mecanístico y a nivel molecular, se conoce que la glicirricina se une directamente a las dos cajas de HMGB1 ($k_d \sim 150 \mu\text{M}$) (174) formando un complejo entre HMGB1-glicirricina que impide la unión de HMGB1 a los receptores de superficie que participan en diferentes etapas del proceso inflamatorio impidiendo así el estado de hiperexcitabilidad neuronal en condiciones dolorosas (177). En modelos de dolor crónico inflamatorio y neuropático también se ha reportado que el uso de glicirricina suprime la activación de la microglía y por ende disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α a nivel es decir bloquea la vía HMGB1/TLR4/NF- $\kappa\beta$ (178). Además, la glicirricina (40, 80, 160 mg/kg, i.p.) disminuye el edema auricular, plantar, la permeabilidad vascular y la expresión del ARNm de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, iNOS y COX-2 inducido por sustancias químicas irritantes (179). Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para corroborar si esto también sucede en nuestro modelo.

9.3. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de TLR4-IN-C34 antagonista del receptor TLR-4

La alarmina HMGB1 es un potente mediador inflamatorio, capaz de activar una gran variedad de receptores entre los que destacan algunos TLRs como TLR-2, TLR-4 y TLR-5, TLR-9. La activación de estos receptores por su interacción de HMGB1 induce hipersensibilidad a los estímulos mecánicos que se manifiesta con la presencia de alodinia e hiperalgesia, en diferentes condiciones de dolor crónico (95). No obstante, el TLR-4 y más recientemente el TLR-5 son los receptores más estudiados en las acciones de HMGB1 en el dolor. Con base en lo anterior en el presente estudio se evaluó si antagonistas selectivos de estos receptores afectaban las conductas nociceptivas inducidas por la inyección intramuscular repetida de SSA usando como herramienta farmacológica el

compuesto TLR4-IN-C34 antagonista potente y selectivo de TLR-4, que está comprobado que inhibe la señalización de TLR-4 tanto *in vivo* como *in vitro*. El antagonista TLR4-IN-C34, es un 2-acetomidopirinosido de molécula pequeña que inhibe a TLR-4 en enterocitos y macrófagos *in vitro*, reduce la inflamación sistémica en ratón, en modelos *in vivo* de endotoxemia y enterocolitis necrosante (180). Además TLR4-IN-C34 también atenúa la inflamación crónica al actuar sobre el eje de señalización TLR4-NF- κ B, al acoplarse al bolsillo hidrofóbico del correceptor de TLR4, la proteína de diferenciación mieloide-2, impidiendo la producción de citocinas proinflamatorias como, IL-1 β , IFN- γ , IL-6, TNF- α , TGF β 1, sin modificar la expresión de citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-10, IL-13 en pruebas *in vitro* (181).

En este estudio encontramos que la administración intratecal de dosis crecientes de TLR4-IN-C34 revirtió la alodinia mecánica inducida por SSA de manera dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que el receptor TLR4 participa en el mantenimiento de la hipersensibilidad al dolor observada en este modelo, y que su activación es probablemente mediante la HMGB1 que se libera después de la aplicación de un estímulo nocivo como lo es la acidez. En la hipersensibilidad inducida por SSA se sugiere que se debe en parte a la activación de los macrófagos residentes en el músculo a través de la activación de TLRs, principalmente el TLR-4, que media la liberación de citocinas, es por ello que la administración del antagonista específico de TLR4-IN-C34 previene el desarrollo de la hipersensibilidad inducida por la administración de SSA (182). Mientras que la administración exógena de HMGB1 a nivel intratecal, produce hipersensibilidad mecánica a través de la activación de TLR-4, esto vinculado al incremento al umbral de retiro a los estímulos mecánicos producidos tras la administración de los antagonistas dirigidos a TLR-4, los compuestos TLR4-IN-C34 y TAK-242, pero no la administración de fármacos antagonistas dirigidos a RAGE y TLR-5. Además que HMGB1 induce la activación de astrocitos espinales que se acompaña del incremento de la expresión de IL-1 β , por lo tanto, la supresión en la activación de estas células previene la hipersensibilidad inducida por HMGB1 (127).

Efectos similares en la alodinia mecánica se han observado utilizando estrategias farmacológicas dirigidas al bloqueo, silenciamiento o inhibición de la formación del

complejo ligando-TLR-4 que impiden la traducción de señales y por ende la producción de citocinas proinflamatoria. TLR-4 se expresa en sitios importantes de la vía del dolor tanto a nivel periférico como central como por ejemplo en neuronas de pequeño diámetro, la microglía y astrocitos. Y está demostrado que TLR-4 regula la activación de la microglía, el microambiente inflamatorio, la sensibilización e hiperexcitabilidad neuronal generando respuesta pronociceptiva (178, 183, 184). Por lo tanto, inhibir su activación interrumpe la síntesis de mediadores proinflamatorios (34). Puesto que los efectos de TLR-4 pueden ser potenciado por la isoforma HMGB1_{ds} resultando en de alodinia e hiperalgesia más marcada (131, 132). Además se ha identificado que HMGB1 incrementa los niveles del ARNm de IL-1 β y MMP-9 en macrófagos y células de Schwann en respuesta a lesión al nervio (126) efecto que se revierte con antagonistas de TLR-4, lo que también suprime la hipersensibilidad mecánica inducida por la HMGB1 y la activación de TLR-4 (127).

La activación de TLR-4, no es ligando específico, por lo tanto, los ligandos pueden ser provisto del medio interno o externo, como el LPS que al activar a TRL-4, conduce a la potenciación de las corrientes de TRPV1 al generar aumento de las concentraciones de Ca²⁺ en las neuronas. Además de forma interesante, se reporta que las neuronas DRG requieren de RAGE para su sensibilización por exposición de LPS (185) y la alarmina HMGB1 se asocia con aumento en la expresión de RAGE en citoplasma y membrana, esta activación del receptor lleva a incrementar la actividad de la vía MAPK que incrementa la expresión de TRL-4 en superficie, sin regular su transcripción o transducción, mientras que la activación de TLR-4 aumenta la transcripción y traducción de RAGE que es traslocado a la superficie celular para unirse a más HMGB1, por lo tanto la interacción TLR-4 y RAGE es fundamental para la respuesta inflamatoria inducida por HMGB1 (103). Puesto que las citocinas liberadas IL-1 β , IL-6, y TNF- α a partir de la activación de estos receptores inducen respuestas nociceptivas por expresión de sus receptores en las terminales de los nociceptores a nivel periférico así como en de las células de la glía a nivel central, lo que rectifica una activación constante que lleva aun estado de hiperexcitabilidad del sistema nervioso (127). Todo los datos muestran el importante papel que desempeña el eje HMGB1/TLR-4 en el dolor crónico en el inicio y desarrollo de esta condición dolorosa, esta vía es un blanco farmacológico para inhibir o atenuar la hipersensibilidad establecida en el dolor crónico (175, 186). Esta evidencia respalda la importancia que presenta el eje

HMGB1-TLR-4 para la transducción de respuesta nociceptivas en la hipersensibilidad inducida por SSA. Por lo tanto, estrategias que inhiban la activación de TLR-4 se asocia con atenuan las respuestas dolorosas (187).

9.4. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de TH1020 antagonista del receptor TLR5

Entre los receptores TLRs asociados a con la transducción de señales por la unión de HMGB1, el TLR-5 es de los receptores de reciente investigación que se suma a la lista de blancos que median la acciones de HMGB1 en condiciones patológicas y por lo tanto se considera un blanco terapéutico para tratar las condiciones dolor crónico particularmente en aquellas que presentan un componente neuroinflamatorio (188). A pesar de que las investigaciones en torno a TLR-5 y su participación en el dolor crónico se encuentra en sus inicios.

En este estudio investigamos si el receptor TLR-5 está involucrado en el mantenimiento de la alodinia mecánica inducida por SSA. Los resultados obtenidos muestran que la administración intratecal del TH1020 un potente antagonista competitivo de TLR-5 ($IC_{50} = 0.85 \pm 0.12 \mu M$) (189), posee efectos benéficos sobre la alodinia mecánica, dado que se observó que TH1020 intratecal incrementó el umbral de retiro a estímulos mecánicos con un efecto de hasta 5 horas. En conjunto estos datos sugieren que el receptor TLR-5 se expresa a nivel de la médula espinal y participa en el mantenimiento de la alodinia mecánica presente en este modelo de dolor crónico.

La evidencia entorno a la participación de TLR-5 en el dolor crónico es reciente. En el 2015 se publicó el TLR-5 co-localizó con NF200 un marcador de fibras nerviosas tipo A altamente mielinizadas y que esta expresado en fibras A δ (120). Además, estudio reciente muestra la participación del TLR-5 en la sensibilización mecánica al prurito y se asocia a la entrada periférica de mecanorreceptores de bajo umbral A β positivos a TLR-5 (190). Las pocas evidencias existentes resaltan el rol de TLR-5 en el dolor crónico a través de HMGB1 que actúa como ligando endógeno y activa la cascada de señalización proinflamatoria a través de NF- κ B resultando en hipersensibilidad al dolor mediante el incremento de los niveles de TNF- α , IL-8 e iNOS (95). Se ha descrito que para la unión de HMGB1 con TLR-

5 se requiere de la región C-terminal de HMGB1, pero aún no se ha identificado si esta región requiera de una conformación específica (95). Por otro lado, existen reportes que muestran que la vía de señalización de TNF- α que se activa posterior a la unión TLR-5/flagelina es parcialmente inhibida por la administración del antagonista TH1020. Además, en ratones Tlr5^{-/-} sometidos a ligadura de nervio espinal L5, se reduce la alodinia táctil unilateral tras la cirugía (191). Aún quedan más estudios por realizar y poder esclarecer la participación de TLR-5 en condiciones de dolor persistente, no obstante, nuestros datos contribuyen a entender la importancia de TLR-5 espinal en el procesamiento del dolor y sugiere que el bloqueo del receptor TLR-5 puede ser una estrategia para el control del dolor. Los efectos de TLR-5 pueden estar relacionados con la expresión del receptor en la terminal central de las fibras A β y A δ y en las láminas profundas a nivel de médula espinal y parecen ser importantes la activación de la cascada proinflamatoria mediada por HMGB1 que lleva a la transcripción de citocinas proinflamatorias, lo que exagera la respuesta dolorosa a los estímulos inocuos o no dolorosos (95).

9.5. Efecto antialodínico producido por la administración intratecal de FPS-ZM1 antagonista del receptor RAGE

La alarmina HMGB1 extracelular actúa uniéndose a los receptores de superficie celular, principalmente los PRR, como RAGE receptor multiligando que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas tipo 1. La evidencia sugiere que el reconocimiento de HMGB1 por RAGE inicia la señalización inflamatoria y de dolor (192). Los avances entorno a las acciones mediadas por HMGB1 son principalmente a nivel de la interacción neuroinmune a nivel del sistema nervioso y está implicado en el dolor crónico neuropático e inflamatorio (108, 140, 155). No obstante, se desconoce si el eje HMGB1-RAGE participa el dolor crónico inducido por SSA.

En este estudio evaluamos la participación del receptor RAGE, en la alodinia mecánica inducida por la inyección de SSA. Los resultados obtenidos muestran que la administración del antagonista específico de RAGE el compuesto FPS-ZM1, posee efectos benéficos sobre la alodinia mecánica, puesto que tras su administración única a nivel intratecal revierte la alodinia mecánica con efectos de 4 horas antes de retornar a valores de alodinia. Estos datos sugieren que el receptor RAGE se expresa a nivel central y funge como un importante

mediador de respuestas nociceptivas en la alodinia mecánica a través de su ligando endógeno la alarmina HMGB1.

La asociación entre HMGB1 y RAGE conduce a la activación de transducción de señales por activación del NF- κ B que inicia la transcripción y síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 β que participan en la sensibilización del sistema nervioso (193). La administración intratecal del anticuerpo dirigido a RAGE inhibe la respuesta de dolor crónico inducido por ligadura de nervios espinales, lo que sugiere la participación de RAGE en la hiperalgesia mecánica presente en el dolor neuropático, por incremento de NF- κ B, TNF- α e IL-1 β postcirugía (193). Puesto que la desregulación de RAGE se ha descrito en muchas condiciones patológicas y la alarmina HMGB1 específicamente el estado todo tiol interactúa con RAGE para promover el dolor nociceptivo como neuropático (105, 132, 193). Se ha identificado la expresión de RAGE a nivel periférico en neuronas aferentes primarias, células de Schwann y células gliales satelitales las cuales potencian la expresión y secreción de HMGB1 dentro del DRG, los nervios espinales lumbares, nervio ciático y tejido de vejiga, después de una lesión nerviosa o exposición a sustancias inflamatorias (106, 129, 133, 147) además de observar su aumento a nivel de médula espinal después del tratamiento con paclitaxel para inducir alodinia mecánica (152). Todos estos datos respaldan la importancia de impedir la activación y transducción de señales a través del eje HMGB1/RAGE, ya sea a nivel periférico como a nivel central, para disminuir las respuestas pronociceptivas mediadas por la alarmina HMGB1 (193). Al ser RAGE receptor crucial para iniciar y activar respuesta inflamatoria, así como para potenciar la excitabilidad neuronal e inducir dolor (194). En estudio *in vitro* el silenciamiento o bloqueo de RAGE por el inhibidor FPS-ZM1 o células knock out de RAGE de DGR no son hipersensibilizadas tras la exposición a LPS, y de esta manera se impide el incremento de potenciales de acción a través de este receptor (185). Sin evitar la producción de IL-6 en macrófagos RAGE^{-/-} peritoneales, debido a que HMGB1 en complejos con ligando endógenos puede enviar señales a través del receptor recíproco del ligando unido, aunque se demuestra que el correceptor RAGE no es necesario para la sinergia de los complejos formados por HMGB1 (195).

En cuanto los efectos mediados por el antagonista selectivo RAGE, el compuesto FPS-ZM1 administrado a nivel plantar posee un efecto de hasta 12h sobre la hipersensibilidad inducida por el dolor óseo asociado a cáncer (196). Puesto que RAGE es crucial para el desarrollo de alodinia mecánica por incremento de HMGB1 a nivel de DRG, pero no en nervio ciático y el pretratamiento con el antagonista FPS-ZM1 inhibe el desarrollo de la alodinia mecánica. Los resultados en este estudio demuestran la participación de RAGE en la alodinia mecánica ya establecida. Lo que podría sugerir que los efectos de HMGB1 a nivel de médula espinal podría ser dependiente a un estado patológico (127).

10. CONCLUSIÓN

La alarmina HMGB1 participa en la hipersensibilidad a los estímulos mecánicos inducido por la administración de solución salina ácida y sus efectos pronociceptivos están mediados principalmente por los receptores TLR-4, RAGE y TLR-5.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar los niveles de expresión del ARNm y la proteína de HMGB1, así como de los receptores TLR-4, TLR-5 y RAGE en el DRG y la médula espinal en diferentes puntos del curso temporal del desarrollo de la hipersensibilidad mecánica inducida por SSA.
- Evaluar los niveles de expresión del ARNm o la proteína de HMGB1 de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 en la médula espinal en diferentes puntos del curso temporal del desarrollo de la hipersensibilidad mecánica inducida por SSA.
- Evaluar si la co-administración de HMGB1 recombinante con SSA en el músculo gastrocnemio potencia los efectos pronociceptivos de la SSA.
- Evaluar si el pretratamiento i.t. o i.m con un Ab antiHMGB1 revierte la hipersensibilidad al dolor inducida por SSA.
- Determinar si el pretratamiento con los antagonistas de TLR-4, TLR-5 y RAGE previene el desarrollo de hipersensibilidad al dolor inducida por SSA.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 1979;6(3):249.
2. Crofford LJ. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2015;126:167-83.
3. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice ASC, et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011;152(10):2204-5.
4. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;161(9):1976-82.
5. Woolf CJ. What is this thing called pain? *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):3742-4.
6. Almeida FC, Castilho A, Cesarino CB, Ribeiro RdCHM, Martins MRI. Correlation between neuropathic pain and quality of life. *BrJP*. 2018;1(4):349-53.
7. Tracey WD, Jr. Nociception. *Current biology* : CB. 2017;27(4):R129-r33.
8. Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*. 2010;16(11):1248-57.
9. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3):S2-S15.
10. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
11. Abraira VE, Ginty DD. The sensory neurons of touch. *Neuron*. 2013;79(4):618-39.
12. McEntire DM, Kirkpatrick DR, Dueck NP, Kerfeld MJ, Smith TA, Nelson TJ, et al. Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2016;9(8):1069-80.
13. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *British journal of anaesthesia*. 2001;87(1):3-11.
14. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17002.
15. Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AK. The cortical representation of pain. *Pain*. 1999;79(2-3):105-11.
16. Heinricher MM. Pain Modulation and the Transition from Acute to Chronic Pain. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;904:105-15.
17. Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(7):502-11.
18. Ossipov M. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica*. 2012;2012:561761.
19. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Current opinion in supportive and palliative care*. 2014;8(2):143-51.

20. Benarroch EEJN. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. 2008;71(3):217-21.
21. Helmstetter FJ, Tershner SA, Poore LH, Bellgowan PS. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Res.* 1998;779(1-2):104-18.
22. Dogrul A, Ossipov MH, Porreca F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res.* 2009;1280:52-9.
23. Guo W, Miyoshi K, Dubner R, Gu M, Li M, Liu J, et al. Spinal 5-HT₃ receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glia signaling cascade. *Molecular pain.* 2014;10:35.
24. Bardin L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behavioural pharmacology.* 2011;22(5-6):390-404.
25. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Progress in neurobiology.* 2006;80(2):53-83.
26. Boadas-Vaello P, Castany S, Homs J, Álvarez-Pérez B, Deulofeu M, Verdú E. Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord.* 2016;54(5):330-40.
27. Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain.* 2019;160(1):19-27.
28. Voscopoulos C, Lema M. When does acute pain become chronic? *British journal of anaesthesia.* 2010;105 Suppl 1:i69-85.
29. Lee, Nassikas NJ, Clauw DJ. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis research & therapy.* 2011;13(2):211.
30. Orhurhu VJ, Roberts JS, Cohen SP. *Ketamine In Acute and Chronic Pain Management.* StatPearls Publishing. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
StatPearls Publishing LLC.; 2019.
31. Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain.* 2015;156(6):1003-7.
32. Goldberg DS, McGee SJ. Pain as a global public health priority. *BMC Public Health.* 2011;11(1):770.
33. Hamood R, Hamood H, Merhasin I, Keinan-Boker L. Chronic pain and other symptoms among breast cancer survivors: prevalence, predictors, and effects on quality of life. *Breast cancer research and treatment.* 2018;167(1):157-69.
34. Jensen TS, Finnerup NBJTLN. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. 2014;13(9):924-35.
35. Nicholas M, Vlaeyen JWS, Rief W, Barke A, Aziz Q, Benoliel R, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain.* 2019;160(1):28-37.
36. Clauw DJ. Fibromyalgia: A Clinical Review. *JAMA.* 2014;311(15):1547-55.

37. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1990;33(2):160-72.
38. Choy EH. The role of sleep in pain and fibromyalgia. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(9):513-20.
39. Stahl SM. Fibromyalgia—pathways and neurotransmitters. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 2009;24(S1):S11-S7.
40. Chinn S, Caldwell W, Gritsenko K. Fibromyalgia pathogenesis and treatment options update. *Current pain and headache reports*. 2016;20(4):25.
41. Branco JC, Bannwarth B, Failde I, Abello Carbonell J, Blotman F, Spaeth M, et al. Prevalence of fibromyalgia: a survey in five European countries. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(6):448-53.
42. Cabo A, Cerdá G, Trillo J. Fibromyalgia: Prevalence, Epidemiologic Profiles and Economic Costs. *Med Clin*. 2017;149(10):441-8.
43. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *The Journal of Rheumatology Supplement*. 2011;86:3-8.
44. Bair MJ, Krebs EE. Fibromyalgia. *Annals of internal medicine*. 2020;172(5):Itc33-itc48.
45. Guinot M, Launois S, Favre-Juvin A, Maindet-Dominici C. Fibromialgia: fisiopatología y apoyo terapéutico. *EMC-Kinesiterapia-Medicina física*. 2015;36(2):1-12.
46. Wu YL, Chang LY, Lee HC, Fang SC, Tsai PS. Sleep disturbances in fibromyalgia: A meta-analysis of case-control studies. *Journal of psychosomatic research*. 2017;96:89-97.
47. Bigatti SM, Hernandez AM, Cronan TA, Rand KL. Sleep disturbances in fibromyalgia syndrome: relationship to pain and depression. *Arthritis and rheumatism*. 2008;59(7):961-7.
48. Bar-On Kalfon T, Gal G, Shorer R, Ablin JN. Cognitive functioning in fibromyalgia: The central role of effort. *Journal of psychosomatic research*. 2016;87:30-6.
49. Segura-Jiménez V, Álvarez-Gallardo IC, Carbonell-Baeza A, Aparicio VA, Ortega FB, Casimiro AJ, et al. Fibromyalgia has a larger impact on physical health than on psychological health, yet both are markedly affected: the al-Ándalus project. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2015;44(5):563-70.
50. Fleming KC, Volcheck MM. Central sensitization syndrome and the initial evaluation of a patient with fibromyalgia: a review. *Rambam Maimonides medical journal*. 2015;6(2).
51. Thieme K, Turk DC, Flor H. Comorbid depression and anxiety in fibromyalgia syndrome: relationship to somatic and psychosocial variables. *Psychosomatic medicine*. 2004;66(6):837-44.
52. Smith HS, Harris R, Clauw D. Fibromyalgia: an afferent processing disorder leading to a complex pain generalized syndrome. *Pain physician*. 2011;14(2):E217-E45.
53. Donnelly CR, Chen O, Ji R-RJTIN. How Do Sensory Neurons Sense Danger Signals? 2020.
54. Littlejohn G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(11):639.

55. von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*. 2012;73(4):638-52.
56. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(9):895-926.
57. Ji R-R, Xu Z-Z, Gao Y-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(7):533-48.
58. Yam M, Loh Y, Tan C, Khadijah Adam S, Abdul Manan N, Basir R. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(8):2164.
59. Woolf Clifford J. Central Sensitization: Uncovering the Relation between Pain and Plasticity. *Anesthesiology*. 2007;106(4):864-7.
60. Ji R-R, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2018;129(2):343-66.
61. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5472):1765-9.
62. Littlejohn, Guymer E. Modulation of NMDA Receptor Activity in Fibromyalgia. *Biomedicines*. 2017;5(2).
63. Luo C, Kuner T, Kuner RJ. Synaptic plasticity in pathological pain. 2014;37(6):343-55.
64. Bannister KJ. Descending pain modulation: influence and impact. 2019;11:62-6.
65. François A, Low SA, Sypek EI, Christensen AJ, Sotoudeh C, Beier KT, et al. A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron*. 2017;93(4):822-39.e6.
66. Gebhart GF. Descending modulation of pain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2004;27(8):729-37.
67. Morgan MM, Whittier KL, Hegarty DM, Aicher SA. Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain*. 2008;140(2):376-86.
68. Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, et al. T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(46):14415-22.
69. Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British journal of anaesthesia*. 2013;111(1):26-37.
70. Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem*. 2006;97(3):772-83.
71. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(7):533-48.
72. Üçeyler N, Zeller D, Kahn AK, Kewenig S, Kittel-Schneider S, Schmid A, et al. Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain*. 2013;136(Pt 6):1857-67.

73. Saria A. Substance P in sensory nerve fibres contributes to the development of oedema in the rat hind paw after thermal injury. *British journal of pharmacology*. 1984;82(1):217-22.
74. Brain SD, Williams TJ. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. *British journal of pharmacology*. 1989;97(1):77-82.
75. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, et al. Mast cells and inflammation. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822(1):21-33.
76. Richardson JD, Vasko MRJJoP, Therapeutics E. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. 2002;302(3):839-45.
77. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the Immune system in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;6(7):521-32.
78. Totsch SK, Sorge RE. Immune System Involvement in Specific Pain Conditions. *Molecular pain*. 2017;13:1744806917724559.
79. Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain, behavior, and immunity*. 2007;21(5):599-616.
80. Raoof R, Willemsen HJLM, Eijkelkamp N. Divergent roles of immune cells and their mediators in pain. *Rheumatology*. 2017;57(3):429-40.
81. Austin PJ, Kim CF, Perera CJ, Moalem-Taylor G. Regulatory T cells attenuate neuropathic pain following peripheral nerve injury and experimental autoimmune neuritis. *Pain*. 2012;153(9):1916-31.
82. Moalem G, Xu K, Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*. 2004;129(3):767-77.
83. Abraham, John. ALS. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(6):440-52.
84. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):291.
85. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216.
86. Kieser KJ, Kagan JC. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(6):376-90.
87. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5566):301-5.
88. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(4):195-202.
89. Wang S, Zhang YJHO. HMGB1 in inflammation and cancer. 2020;13(1):116.
90. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clinical cancer research*. 2013;19(15):4046-57.

91. Yang H, Lundback P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, et al. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2012;18:250-9.
92. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(25):16722-9.
93. Yang H, Wang H, Chavan SS, Andersson U. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;21 Suppl 1(Suppl 1):S6-s12.
94. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(6):865-73.
95. Das N, Dewan V, Grace PM, Gunn RJ, Tamura R, Tzarum N, et al. HMGB1 activates proinflammatory signaling via TLR5 leading to allodynia. *Cell reports*. 2016;17(4):1128-40.
96. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. Cutting edge: HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *The Journal of Immunology*. 2000;165(6):2950-4.
97. Chen., Sun W, Gao R, Su Y, Umehara H, Dong L, et al. The role of high mobility group box chromosomal protein 1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2013;52(10):1739-47.
98. Sekiguchi F, Kawabata A. Role of HMGB1 in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
99. Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Seminars in immunology*. 2018;38:40-8.
100. Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *European journal of immunology*. 2004;34(6):1503-12.
101. Lian Y-J, Gong H, Wu T-Y, Su W-J, Zhang Y, Yang Y-Y, et al. Ds-HMGB1 and fr-HMGB induce depressive behavior through neuroinflammation in contrast to nonoxid-HMGB1. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;59:322-32.
102. Raucci A, Di Maggio S, Scavello F, D'Ambrosio A, Bianchi ME, Capogrossi MC. The Janus face of HMGB1 in heart disease: a necessary update. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(2):211-29.
103. Zhong H, Li X, Zhou S, Jiang P, Liu X, Ouyang M, et al. Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2020;205(3):767-75.
104. Lee., Kwak MS, Kim S, Shin J-S. The role of high mobility group box 1 in innate immunity. *Yonsei medical journal*. 2014;55(5):1165-76.
105. Allette YM, Due MR, Wilson SM, Feldman P, Ripsch MS, Khanna R, et al. Identification of a functional interaction of HMGB1 with Receptor for Advanced Glycation End-products in a model of neuropathic pain. *Brain, behavior, and immunity*. 2014;42:169-77.
106. Shibasaki M, Sasaki M, Miura M, Mizukoshi K, Ueno H, Hashimoto S, et al. Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Pain*. 2010;149(3):514-21.

107. Liu R, Mori S, Wake H, Zhang J, Liu K, Izushi Y, et al. Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. *Acta Med Okayama*. 2009;63(4):203-11.
108. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology*. 2010;28:367-88.
109. Wu., Zheng JJ, Bai YH, Xia P, Zhang HC, Guo Y. HMGB1/RAGE axis mediates the apoptosis, invasion, autophagy, and angiogenesis of the renal cell carcinoma. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:4501-10.
110. Harada S, Matsuura W, Liu K, Nishibori M, Tokuyama S. Possible involvement of the HMGB1/RAGE signaling mechanism in the induction of central post-stroke pain induced by acute global cerebral ischemia. *Brain research*. 2016;1646:433-40.
111. Ji R-R, Chamesian A, Zhang Y-QJS. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. 2016;354(6312):572-7.
112. Agalave NM, Larsson M, Abdelmoaty S, Su J, Baharpoor A, Lundback P, et al. Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis. *Pain*. 2014;155(9):1802-13.
113. Li Y, Zhang H, Zhang H, Kosturakis AK, Jawad AB, Dougherty PM. Toll-like receptor 4 signaling contributes to Paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *The Journal of Pain*. 2014;15(7):712-25.
114. Goulopoulou S, McCarthy CG, Webb RC. Toll-like receptors in the vascular system: sensing the dangers within. *Pharmacological reviews*. 2016;68(1):142-67.
115. Vadillo E, Pelayo R. Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Revista de Investigación Clínica*. 2012;64(5):461-76.
116. Lacagnina MJ, Watkins LR, Grace PM. Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacology & therapeutics*. 2018;184:145-58.
117. Zhao, Perez JS, Lu K, George AJ, Ma D. Role of Toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014;306(8):F801-F11.
118. Tanga FY, Natile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(16):5856-61.
119. Yang H, Wang H, Ju Z, Ragab AA, Lundbäck P, Long W, et al. MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015;212(1):5-14.
120. Xu ZZ, Kim YH, Bang S, Zhang Y, Berta T, Wang F, et al. Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat Med*. 2015;21(11):1326-31.
121. Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *The Journal of pediatrics*. 2004;144(4):421-9.
122. Ren, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature medicine*. 2010;16(11):1267.
123. Cao L, Tanga FY, DeLeo JA. The contributing role of CD14 in toll-like receptor 4 dependent neuropathic pain. *Neuroscience*. 2009;158(2):896-903.

124. Moreno JAM, López JCH, Urcuqui-Inchima S. La estimulación de TLR, receptores tipo NOD y dectina-1 en neutrófilos humanos induce la producción de citocinas proinflamatorias. *Iatreia*. 2014;27(2):135-46.
125. Chacur M, Milligan ED, Gazda LS, Armstrong C, Wang H, Tracey KJ, et al. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain*. 2001;94(3):231-44.
126. Zhang, Morioka N, Harano S, Nakamura Y, Liu K, Nishibori M, et al. Perineural expression of high-mobility group box-1 contributes to long-lasting mechanical hypersensitivity via matrix metalloproteinase-9 up-regulation in mice with painful peripheral neuropathy. *Journal of neurochemistry*. 2016;136(4):837-50.
127. Morioka N, Miyauchi K, Miyashita K, Kochi T, Zhang FF, Nakamura Y, et al. Spinal high-mobility group box-1 induces long-lasting mechanical hypersensitivity through the toll-like receptor 4 and upregulation of interleukin-1 β in activated astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 2019;150(6):738-58.
128. O'Connor KA, Hansen MK, Rachal Pugh C, Deak MM, Biedenkapp JC, Milligan ED, et al. Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. *Cytokine*. 2003;24(6):254-65.
129. Nishida T, Tsubota M, Kawaishi Y, Yamanishi H, Kamitani N, Sekiguchi F, et al. Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats. *Toxicology*. 2016;365:48-58.
130. Tanaka J, Seki Y, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Yamaguchi K, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB 1-dependent hyperalgesia in rats. 2013;170(6):1233-41.
131. Tsujita R, Tsubota M, Hayashi Y, Saeki H, Sekiguchi F, Kawabata A. Role of Thrombin in Soluble Thrombomodulin-Induced Suppression of Peripheral HMGB1-Mediated Allodynia in Mice. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2018;13(2):179-88.
132. Yamasoba D, Tsubota M, Domoto R, Sekiguchi F, Nishikawa H, Liu K, et al. Peripheral HMGB1-induced hyperalgesia in mice: Redox state-dependent distinct roles of RAGE and TLR4. *Journal of pharmacological sciences*. 2016;130(2):139-42.
133. Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Seki Y, et al. Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology*. 2014;79:112-8.
134. Kouzoukas DE, Ma F, Meyer-Siegler KL, Westlund KN, Hunt DE, Vera PL. Protease-Activated Receptor 4 Induces Bladder Pain through High Mobility Group Box-1. *PloS one*. 2016;11(3):e0152055-e.
135. Nicholas M, Vlaeyen JW, Rief W, Barke A, Aziz Q, Benoliel R, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain*. 2019;160(1):28-37.
136. Treede R-D, Jensen T, Campbell J, Cruccu G, Dostrovsky J, Griffin J, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. 2008;70(18):1630-5.
137. Feldman P, Due MR, Ripsch MS, Khanna R, White FA. The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1):180.
138. Hisaoka-Nakashima K, Tomimura Y, Yoshii T, Ohata K, Takada N, Zhang FF, et al. High-mobility group box 1-mediated microglial activation induces anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2019;92:347-62.

139. Nakamura Y, Morioka N, Abe H, Zhang FF, Hisaoka-Nakashima K, Liu K, et al. Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1. *PLoS one*. 2013;8(8):e73640.
140. Otsu K-i, Kikuchi S-i, Kato K, Sekiguchi M, Konno S-i. Anti-HMGB1 neutralization antibody improves pain-related behavior induced by application of autologous nucleus pulposus onto nerve roots in rats. *Spine*. 2011;36(11):E692-E8.
141. Tian J, Song T, Wang W, Wang H, Zhang Z. miR-129-5p Alleviates Neuropathic Pain Through Regulating HMGB1 Expression in CCI Rat Models. *J Mol Neurosci*. 2020;70(1):84-93.
142. Zhan L-Y, Lei S-Q, Zhang B-H, Li W-L, Wang H-X, Zhao B, et al. Overexpression of miR-381 relieves neuropathic pain development via targeting HMGB1 and CXCR4. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;107:818-23.
143. Zhang J, Zhang H, Zi T. Overexpression of microRNA-141 relieves chronic constriction injury-induced neuropathic pain via targeting high-mobility group box 1. *Int J Mol Med*. 2015;36(5):1433-9.
144. Zhang Y, Mou J, Cao L, Zhen S, Huang H, Bao H. MicroRNA-142-3p relieves neuropathic pain by targeting high mobility group box 1. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):501-10.
145. Liu, Wang Z, Qiu Y, Wei M, Li C, Xie Y, et al. Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *Journal of neuroinflammation*. 2017;14(1):70.
146. Ma Y-Q, Chen Y-R, Leng Y-F, Wu Z-W. Tanshinone IIA downregulates HMGB1 and TLR4 expression in a spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014.
147. He Z, Guo Q, Xiao M, He C, Zou W. Intrathecal lentivirus-mediated transfer of interleukin-10 attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through modulation of spinal high-mobility group box 1 in rats. *Pain Physician*. 2013;16(5):E615-25.
148. Ren, Zhang Y, Zhang X-D, An L-J, Lv H-G, He J, et al. High-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia and spinal astrocytic activation in a mouse model of type 2 diabetes. *Brain research bulletin*. 2012;88(4):332-7.
149. Thakur V, Sadanandan J. High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling in Painful Diabetic Neuropathy. 2020;21(3).
150. Bestall SM, Hulse RP, Blackley Z, Swift M, Ved N, Paton K, et al. Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB-1-RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions. *Journal of cell science*. 2018;131(14).
151. Wu B, Guo Y, Chen Q, Xiong Q, Min S. MicroRNA-193a Downregulates HMGB1 to Alleviate Diabetic Neuropathic Pain in a Mouse Model. *Neuroimmunomodulation*. 2019:1-8.
152. Sekiguchi F, Domoto R, Nakashima K, Yamasoba D, Yamanishi H, Tsubota M, et al. Paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and its implication for peripheral neuropathy in mice: Evidence for a neuroimmune crosstalk. *Neuropharmacology*. 2018;141:201-13.
153. Tsubota M, Fukuda R, Hayashi Y, Miyazaki T, Ueda S, Yamashita R, et al. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16(1):199-.

154. Gu H, Wang C, Li J, Yang Y, Sun W, Jiang C, et al. High mobility group box-1-toll-like receptor 4-phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-mediated generation of matrix metalloproteinase-9 in the dorsal root ganglion promotes chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International journal of cancer*. 2019.
155. Irie Y, Tsubota M, Ishikura H, Sekiguchi F, Terada Y, Tsujiuchi T, et al. Macrophage-derived HMGB1 as a Pain Mediator in the Early Stage of Acute Pancreatitis in Mice: Targeting RAGE and CXCL12/CXCR4 Axis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2017;12(4):693-707.
156. Shen W, Xu X, Zhai N, Zhou Z, Shao J, Yu Y. Potential mechanisms of microRNA-141-3p to alleviate chronic inflammatory pain by downregulation of downstream target gene HMGB1: in vitro and in vivo studies. *Gene therapy*. 2017;24(6):353-60.
157. Qiu C, Yang L-D, Yu W, Tian D-D, Gao M-R, Wang W-J, et al. Paeonol ameliorates CFA-induced inflammatory pain by inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B p65 pathway. 2021;36(2):273-83.
158. Rudjito R, Agalave NM, Farinotti AB, Lundbäck P, Szabo-Pardi TA, Price TJ, et al. Sex- and cell-dependent contribution of peripheral high mobility group box 1 and TLR4 in arthritis-induced pain. *Pain*. 2021;162(2):459-70.
159. NOM-062-ZOO- NOM, LA PRODUCCION ETP. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación México*; 1999.
160. PALOMARES LG. Evaluación del efecto analgésico de la combinación tramadol-meloxicam en modelos murinos de dolor crónico. 2020.
161. Sluka K, Kalra A, Moore S. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. 2001;24(1):37-46.
162. Sluka K, Kalra A, Moore SJM, Medicine NOJotAAoE. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. 2001;24(1):37-46.
163. Dueñas M, Ojeda B, Salazar A, Mico JA, Failde IJopr. A review of chronic pain impact on patients, their social environment and the health care system. 2016;9:457.
164. Gaskin DJ, Richard P. The economic costs of pain in the United States. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2012;13(8):715-24.
165. Nicholas M, Vlaeyen JW, Rief W, Barke A, Aziz Q, Benoliel R, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. 2019;160(1):28-37.
166. Chen W-N, Lee C-H, Lin S-H, Wong C-W, Sun W-H, Wood JN, et al. Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1. 8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. 2014;10:1744-8069-10-40.
167. Sharma NK, Ryals JM, Liu H, Liu W, Wright DE. Acidic saline-induced primary and secondary mechanical hyperalgesia in mice. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(12):1231-41.
168. Reichling DB, Levine JD. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends in neurosciences*. 2009;32(12):611-8.

169. Lin CC, Chen WN, Chen CJ, Lin YW, Zimmer A, Chen CC. An antinociceptive role for substance P in acid-induced chronic muscle pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(2):E76-83.
170. Yen LT, Hsieh CL, Hsu HC, Lin YW. Preventing the induction of acid saline-induced fibromyalgia pain in mice by electroacupuncture or APETx2 injection. *Acupuncture in medicine : journal of the British Medical Acupuncture Society*. 2020;38(3):188-93.
171. Sluka KA, Rohlwing JJ, Bussey RA, Eikenberry SA, Wilken JM. Chronic muscle pain induced by repeated acid Injection is reversed by spinally administered mu- and delta-, but not kappa-, opioid receptor agonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;302(3):1146-50.
172. Galeotti N, Ghelardini C, Bartolini A. Involvement of potassium channels in amitriptyline and clomipramine analgesia. *Neuropharmacology*. 2001;40(1):75-84.
173. Bie B, Zhu W, Pan ZZ. Rewarding morphine-induced synaptic function of delta-opioid receptors on central glutamate synapses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009;329(1):290-6.
174. Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chemistry & biology*. 2007;14(4):431-41.
175. Velazquez I, Salinas-Abarca A, De la Luz Cuellar Y, Bravo-Hernández M, Granados-Soto V. (196) Role of HMGB1 and TLR4 receptor in a chronic stress-induced pain model in rats. *The Journal of Pain*. 2017;18(4):S25.
176. Kouzoukas, Ma F, Meyer-Siegler KL, Westlund KN, Hunt DE, Vera PL. Protease-activated receptor 4 induces bladder pain through high mobility group box-1. *PloS one*. 2016;11(3):e0152055.
177. Nishibori M, Wang D, Ousaka D, Wake H. High Mobility Group Box-1 and Blood-Brain Barrier Disruption. *Cells*. 2020;9(12).
178. Sun X, Zeng H, Wang Q, Yu Q, Wu J, Feng Y, et al. Glycyrrhizin ameliorates inflammatory pain by inhibiting microglial activation-mediated inflammatory response via blockage of the HMGB1-TLR4-NF- κ B pathway. *Experimental cell research*. 2018;369(1):112-9.
179. Wang H-L, Li Y-X, Niu Y-T, Zheng J, Wu J, Shi G-J, et al. Observing anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of glycyrrhizin through regulating COX-2 and pro-inflammatory cytokines expressions in mice. 2015;38(6):2269-78.
180. Neal MD, Jia H, Eyer B, Good M, Guerriero CJ, Sodhi CP, et al. Discovery and validation of a new class of small molecule Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors. *PLoS One*. 2013;8(6):e65779.
181. Adegoke EO, Adeniran SO, Zeng Y, Wang X, Wang H, Wang C, et al. Pharmacological inhibition of TLR4/NF- κ B with TLR4-IN-C34 attenuated microcystin-leucine arginine toxicity in bovine Sertoli cells. 2019;39(6):832-43.
182. Gong W-Y, Abdelhamid RE, Carvalho CS, Sluka KAJTJoP. Resident macrophages in muscle contribute to development of hyperalgesia in a mouse model of noninflammatory muscle pain. 2016;17(10):1081-94.
183. Velázquez I, Salinas-Abarca A, De la Luz Cuellar Y, Bravo-Hernández M, Granados-Soto V. Role of HMGB1 and TLR4 receptor in a chronic stress-induced pain model in rats. *The Journal of Pain*. 2017;18(4):S25.

184. Su W, Cui H, Wu D, Yu J, Ma L, Zhang X, et al. Suppression of TLR4-MyD88 signaling pathway attenuated chronic mechanical pain in a rat model of endometriosis. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):65.
185. Nair M, Jagadeeshan S, Katselis G, Luan X, Momeni Z, Henao-Romero N, et al. Lipopolysaccharides induce a RAGE-mediated sensitization of sensory neurons and fluid hypersecretion in the upper airways. *Scientific reports*. 2021;11(1):8336.
186. Wan W, Cao L, Khanabdali R, Kalionis B, Tai X, Xia SJ. The emerging role of HMGB1 in neuropathic pain: a potential therapeutic target for neuroinflammation. 2016;2016.
187. Bruno K, Woller SA, Miller YI, Yaksh TL, Wallace M, Beaton G, et al. Targeting toll-like receptor-4 (TLR4)-an emerging therapeutic target for persistent pain states. *Pain*. 2018;159(10):1908-15.
188. Kingwell K. TLR5 opens the door to neuropathic-pain treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(12):818-9.
189. Yan L, Liang J, Yao C, Wu P, Zeng X, Cheng K, et al. Pyrimidine Triazole Thioether Derivatives as Toll-Like Receptor 5 (TLR5)/Flagellin Complex Inhibitors. *ChemMedChem*. 2016;11(8):822-6.
190. Pan H, Fatima M, Li A, Lee H, Cai W, Horwitz L, et al. Identification of a Spinal Circuit for Mechanical and Persistent Spontaneous Itch. *Neuron*. 2019;103(6):1135-49.e6.
191. Stokes JA, Cheung J, Eddinger K, Corr M, Yaksh TL. Toll-like receptor signaling adapter proteins govern spread of neuropathic pain and recovery following nerve injury in male mice. *J Neuroinflammation*. 2013;10:148.
192. Agalave NM, Svensson CI. Extracellular high-mobility group box 1 protein (HMGB1) as a mediator of persistent pain. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;20(1):569-78.
193. Li X, Yang H, Ouyang Q, Liu F, Li J, Xiang Z, et al. Enhanced RAGE Expression in the Dorsal Root Ganglion May Contribute to Neuropathic Pain Induced by Spinal Nerve Ligation in Rats. *Pain Medicine*. 2015;17(5):803-12.
194. Zhang XS, Li X, Luo HJ, Huang ZX, Liu CC, Wan Q, et al. Activation of the RAGE/STAT3 Pathway in the Dorsal Root Ganglion Contributes to the Persistent Pain Hypersensitivity Induced by Lumbar Disc Herniation. *Pain Physician*. 2017;20(5):419-27.
195. Hreggvidsdóttir HS, Lundberg AM, Aveberger A-C, Klevenvall L, Andersson U, Harris HE. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1)-Partner Molecule Complexes Enhance Cytokine Production by Signaling Through the Partner Molecule Receptor. *Molecular Medicine*. 2012;18(2):224-30.
196. Okui T, Hiasa M, Ryumon S, Ono K, Kunisada Y, Ibaragi S, et al. The HMGB1/RAGE axis induces bone pain associated with colonization of 4T1 mouse breast cancer in bone. *Journal of Bone Oncology*. 2021;26:100330.