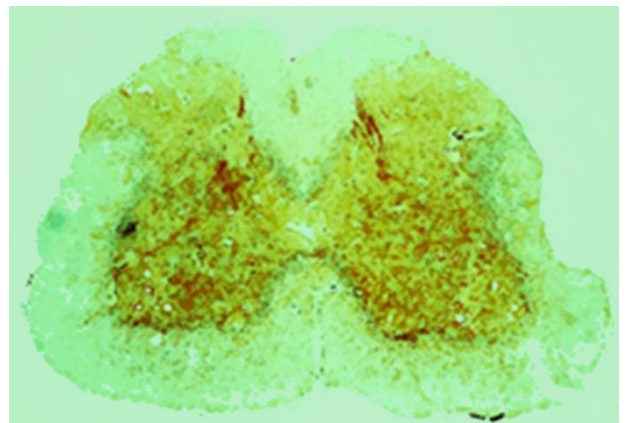
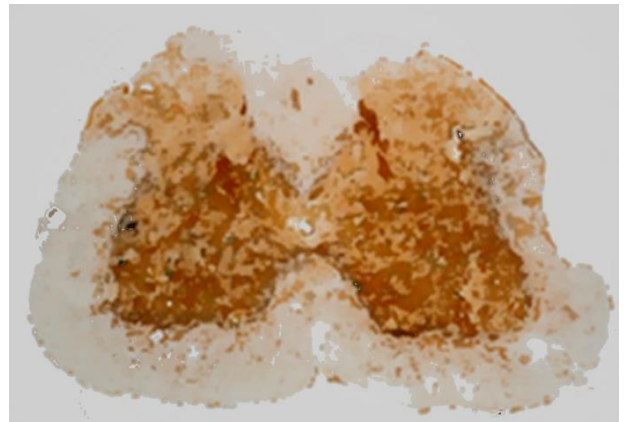
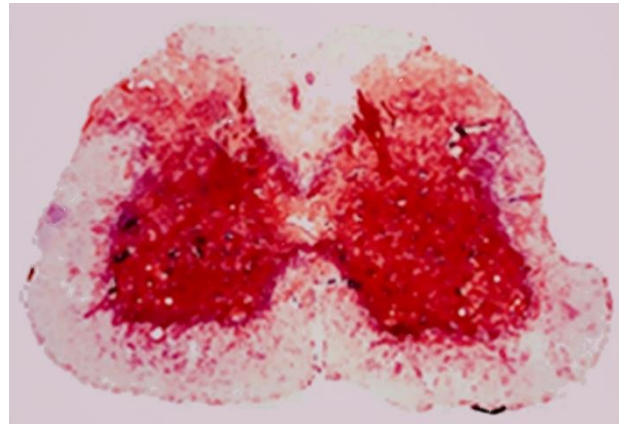
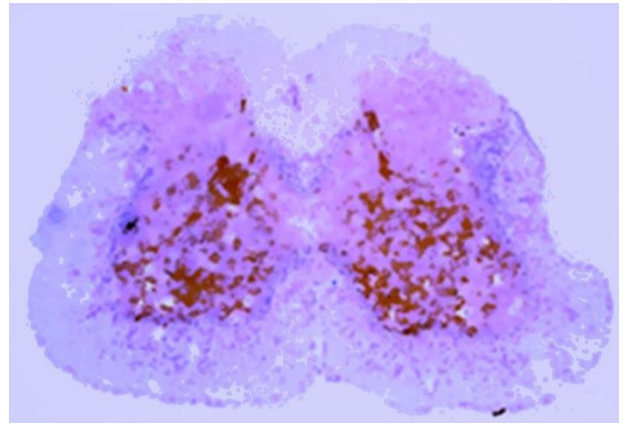


POTENCIAL ANALGÉSICO DE LOS CANALES IÓNICOS DE POTASIO K_v7 EN PROCESOS DE DOLOR

PROGRAMA DE DOCTORADO
EN SEÑALIZACIÓN CELULAR

JORGE VICENTE BAZ

2021



Universidad de Alcalá

Universidad de Alcalá

Departamento de Biología de Sistemas

Doctorado en Señalización Celular



Universidad de Alcalá

Potencial analgésico de los canales iónicos de potasio K_v7 en procesos de dolor

Tesis Doctoral presentada por

Jorge Vicente Baz

Director: Dr. Iván Rivera Arconada

Alcalá de Henares, 2021

Publicaciones

Publicaciones incluidas en la Tesis Doctoral

Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, Rivera-Arconada I. Effects of novel subtype selective M-current activators on spinal reflexes in vitro: comparison with retigabine. *Neuropharmacology* 2016, 109:131-138.

Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, Rivera-Arconada I. Implication of K_v7 Channels in the Spinal Antinociceptive Actions of Celecoxib. *J Pharmacol Exp Ther* 2019, 370(3):472-479.

Vicente-Baz J, Rivera-Arconada I. Spinal Actions of the NSAID Diclofenac on Nociceptive Transmission in Comparison to the K_v7 Channel Opener Flupirtine. *Neuroscience* 2020, 440: 186-195.

Otras publicaciones

Rivera-Arconada I, **Vicente-Baz J**, Lopez-Garcia JA. Targeting K_v7 channels in pain pathways. *Oncotarget* 2017, 8(8): 12554-12555.

Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, Rivera-Arconada I. Spontaneously active circuits acting on central terminals of primary afferents within the spinal cord are affected by peripheral inflammation. *Eur J Pain*. En revisión.

Comunicaciones a congresos

Roza C, **Vicente-Baz J**, Garcia-Aldea A, Rivera-Arconada I, Lopez-Garcia JA. Specific modulation of M- and N-type channels alters spinal nociceptive transmission. Presentación de póster en el Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2014). Washington DC, 2014. 158-08.

Vicente-Baz J, Rivera-Arconada I, Lopez-Garcia JA. Effects of novel K_v7 channels modulators on spinal nociceptive transmission. Presentación de poster en el 5th Workshop on Structure and Function of Ion Channels and Transporters. Lisboa, 2015. P8.

Vicente-Baz J, Rivera-Arconada I. Efectos de celecoxib en la actividad de neuronas del asta dorsal de la médula espinal: Implicación de los canales K_v7 . Comunicación oral en el II Congreso de Señalización Celular. Alcalá de Henares, 2017. Sesión 2B - Fisiología.

Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, Lucas-Romero J, Rivera-Arconada I. NSAIDs diclofenac and celecoxib depress spinal nociceptive transmission in vitro acting on K_v7 channels. Presentación de póster en el 11th FENS Forum of Neuroscience. Berlín, 2018. P183 - D.07.b Pain: spinal cord processing. Abstract 2993.

Vicente-Baz J, Rivera-Arconada I. Estudio de los ritmos de actividad intrínseca en áreas sensoriales y motoras de la médula espinal de ratón. Comunicación oral en el IV Congreso de Señalización Celular. Alcalá de Henares, 2019. Sesión 2B - Fisiología.

Vicente-Baz J, Rivera-Arconada I, Lopez-Garcia JA. Inflammation-induced changes in spontaneous activity recorded from primary afferents. Presentación de poster en el 18th SENC Meeting. Santiago de Compostela, 2019.

Índice

Abreviaturas	III
Resumen	V
Abstract	VII
Introducción	1
<u>Clasificación y epidemiología de dolor</u>	3
1.1 Clasificación del dolor	3
1.2 Epidemiología del dolor	5
<u>Organización de las vías nociceptivas</u>	6
2.1 Neuronas aferentes primarias	6
2.2 Anatomía general de la médula espinal	8
2.3 Organización funcional de la médula espinal	10
2.3.1 Asta dorsal de la médula espinal	11
2.3.2 Asta ventral de la médula espinal	23
2.3.3 Vías ascendentes y descendentes	25
<u>Canales de potasio</u>	28
3.1 Canales de potasio dependientes de voltaje	30
3.1.1 Estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje	31
3.1.2 Canales de potasio dependientes de voltaje y excitabilidad neuronal: implicación en la nocicepción	35
3.2 Canales de potasio K_v7	38
3.2.1 Estructura y modulación de los canales K _v 7	38
3.2.2 Expresión de los canales K _v 7.....	40
3.2.3 Fisiología de los canales K _v 7	42
3.2.4 Farmacología de los canales K _v 7	43
3.2.5 Canales K _v 7 y nocicepción	46
Objetivos	53
Resultados	57
<u>Capítulo 1: Effects of novel subtype selective M-current activators on spinal reflexes <i>in vitro</i>: Comparison with retigabine</u>	59
<u>Capítulo 2: Implication of K_v7 Channels in the Spinal Antinociceptive Actions of Celecoxib</u>	73
<u>Capítulo 3: Spinal Actions of the NSAID Diclofenac on Nociceptive Transmission in Comparison to the K_v7 Channel Opener Flupirtine</u>	83
Discusión general	95
Acciones de nuevos facilitadores de los canales K _v 7.....	97
Mecanismos de acción molecular de los facilitadores de canales K _v 7	99
Acciones de otros analgésicos sobre los canales K _v 7	100
Conclusiones	103
Referencias Bibliográficas	107

Abreviaturas

4-AP - 4-aminopiridina

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

BDNF - Factor neurotrófico derivado del cerebro

BFNS - Convulsiones neonatales familiares benignas

CCI - Modelo de neuropatía experimental por daño por constricción crónica

CFA - Adyuvante completo de Freund

CGRP - Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

COX - Ciclooxygenasa

CR - Calretinina

DMSO - Dimetil sulfóxido

DYN - Dinorfina

GABA - Ácido gamma-aminobutírico

GAL - Galanina

IASP - Asociación Internacional para el Estudio del Dolor

IB4 - Isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia*

IP3 - Inositol trifosfato

K_{2P} - Canales de potasio de dos poros

K_{Ca} - Canales de potasio activados por calcio

K_{ir} - Canales de potasio rectificadores internos

K_v - Canales de potasio dependientes de voltaje

LCRA - Líquido cefalorraquídeo artificial

LTMR - Mecanorreceptor de bajo umbral

Mrgpr - Receptor acoplado a proteína G relacionado con el gen Mas

NAPQI - N-acetil-p-benzoquinoneimina

NCS1 - Sensor de calcio neuronal 1

NK-1 - Neurokinina 1

NMDA - Ácido N-metil-D-aspartico

Abreviaturas

nNos - Óxido nítrico sintasa neuronal

NPY - Neuropeptido Y

PAR-2 - Receptor activado por proteasas 2

PIP₂ - Fosfatidil inositol bisfosfato

PKC - Proteína quinasa C

PLC - Fosfolipasa C

PV - Parvalbúmina

REST - Silenciador de la transcripción del elemento represor-1

RMS - Reflejo monosináptico

ROR α - Receptor huérfano relacionado con retinoides alfa

RVB - Reticular ventrobulbar

SNI - Modelo de neuropatía experimental "Spared nerve injury"

SNC - Sistema nervioso central

SNP - Sistema nervioso periférico

TEA - Tetraetilamonio

TRPM8 - Receptor de potencial transitorio melastatina 8

TRPV1 - Receptor de potencial transitorio vaniloide 1

VGLUT - Transportador de glutamato

Resumen

El dolor crónico constituye uno de los principales problemas sanitarios en los países desarrollados, siendo una de las causas más frecuentes de sufrimiento e incapacidad. La utilización de fármacos analgésicos es una vía importante en el tratamiento del dolor. Sin embargo, diversas patologías que cursan con dolor todavía carecen de tratamientos eficaces. El estudio de los canales iónicos como diana farmacológica en analgesia constituye un área de investigación que ha crecido mucho en los últimos años. Los canales de potasio de la familia K_v7 son importantes reguladores de la excitabilidad neuronal. Se expresan en diferentes elementos de las vías nociceptivas, incluidas las neuronas aferentes primarias y la médula espinal, y su activación es capaz de producir analgesia. El desarrollo de los canales K_v7 como diana terapéutica requiere de una mejor caracterización de su papel en las vías nociceptivas, así como de fármacos específicos y selectivos para evitar efectos no deseados.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido estudiar las acciones de ICA-069673 y ML213, dos nuevos facilitadores de los canales K_v7 , sobre el procesamiento de la información nociceptiva en la médula espinal. Además, se ha querido estudiar el papel antinociceptivo de los antiinflamatorios celecoxib y diclofenaco a nivel espinal, y comprobar la implicación de los canales K_v7 en sus efectos. Para llevar a cabo estos objetivos se realizaron estudios electrofisiológicos y farmacológicos en preparaciones de médula espinal de ratón mantenidas en condiciones *in vitro*. Se registraron los reflejos espinales nociceptivos y no nociceptivos y las respuestas de neuronas del asta dorsal a la estimulación eléctrica de las aferentes primarias nociceptivas.

En las condiciones utilizadas, los compuestos estudiados deprimieron la transmisión nociceptiva espinal con un perfil de acción similar a otros fármacos analgésicos, afectando preferentemente al *wind-up* de los reflejos espinales. Además, ML213 y celecoxib inhibieron las respuestas de neuronas del asta dorsal a la estimulación de aferentes nociceptivas, indicando una acción directa sobre las neuronas sensoriales. Sin embargo, diclofenaco mostró sobre todo efectos en el componente motor de la médula espinal. El bloqueo previo de los canales K_v7 con XE-991 fue capaz de prevenir estos efectos depresores, lo que sugiere que la activación de los canales K_v7 es el principal mecanismo de acción de estos fármacos.

En conjunto, estos resultados refuerzan la importancia de los canales K_v7 en la modulación de la excitabilidad de las vías nociceptivas y su validez como diana terapéutica para el tratamiento del dolor. Los efectos observados con estos moduladores de canales K_v7 indican que podrían existir conformaciones distintas de estos canales entre los circuitos espinales sensoriales y motores. Estas diferencias podrían permitir diseñar fármacos analgésicos selectivos sobre los canales K_v7 presentes en áreas sensoriales de la médula espinal y que no afecten a las funciones motoras.



Abstract

Chronic pain is one of the main health issues in developed countries, being one of the most frequent causes of suffering and disability. Analgesic drugs are used as a principal treatment of pain, however some pathologies lack an effective treatment. The study of ionic channels as new targets for analgesic drugs constitutes an increasing research area. K_v7 potassium channels are responsible for the control and regulation of neuronal excitability. These channels are expressed in nociceptive pathways, including primary afferents and spinal cord neurons, and its activation can produce analgesia. Developing K_v7 channels as new pharmacological target require a better characterization of the role of these channels in nociceptive pathways but also the availability of specific and selective drugs in order to avoid undesirable effects.

Here we explore the mechanism of action of ICA-069673 and ML213, two new K_v7 channel openers, on the processing of nociceptive information at the spinal cord level. In addition, the antinociceptive actions of the non-steroidal anti-inflammatory drugs celecoxib and diclofenac at the spinal level and the role of K_v7 channels in its effects were studied. To this end, we used electrophysiological and pharmacological approaches in an *in vitro* preparation of the mouse spinal cord. Nociceptive and non-nociceptive spinal reflexes and dorsal horn neurons' responses to the stimulation of nociceptors were recorded.

These drugs produce a depression of spinal nociceptive transmission manifested as a profound inhibition of the wind-up of spinal reflexes, a signature common to several analgesics. Furthermore, ML213 and celecoxib inhibited the responses of dorsal horn neurons to the stimulation of nociceptive primary afferents, indicating a specific action on sensory neurons. In contrast, diclofenac effects were concentrated on the motor areas of the spinal cord. Blockade of K_v7 channels with XE-991 prevented these depressant effects, suggesting that activation of these channels is the main mechanism of action of these drugs.

Taken together, these results consolidate the importance of K_v7 channels in the control of the excitability of nociceptive pathways and their validity as a therapeutic target for the treatment of pain. The effects observed with these K_v7 channel modulators suggest that different conformations of these channels could exist in the sensory and motor spinal circuits. These differences could allow the design of analgesic drugs selective for K_v7 channels located in sensory but not in motor regions of the spinal cord.



Introducción



Clasificación y epidemiología de dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), definió en 1979 el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o que se describe como ocasionada por dicho daño”. Esta definición ha sido ampliamente aceptada por profesionales de la salud e investigadores en el campo del dolor y adoptada por varias organizaciones profesionales a lo largo de los años. Sin embargo, en el año 2018, la IASP formó un grupo de trabajo para evaluar si se debía actualizar o mantener dicha definición. Este grupo de expertos estuvo deliberando durante dos años y desde el 2020 el dolor se define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada con daño tisular real o potencial” (Raja y cols, 2020).

1.1 Clasificación del dolor

En dolor se ha clasificado en diferentes formas atendiendo a distintos criterios. Por un lado, Cervero y Laird (1991) plantearon una clasificación del dolor que se basa en las características del estímulo nociceptivo y la respuesta al mismo. De esta manera describieron tres tipos de dolor que se producen por mecanismos neurobiológicos diferentes (ver también Woolf y Salter, 2000).

El **dolor nociceptivo** se produce cuando un estímulo de alta intensidad ya sea mecánico, térmico o químico, activa los nociceptores y existe un procesamiento convencional de esta información a través de las vías nociceptivas. Se trata de un sistema fisiológico que alerta al individuo de un posible daño y existe una correlación estrecha entre la intensidad y el curso temporal del estímulo nocivo y la sensación dolorosa.

El **dolor inflamatorio** está ligado a una lesión tisular y se trata de un proceso fisiológico que representa la plasticidad que muestra el sistema nociceptivo. La lesión tisular activa el sistema inmune y genera una sensibilización que reduce el umbral de activación y aumenta la excitabilidad de las neuronas nociceptivas. En este caso existe una relación aumentada entre la intensidad del estímulo y la magnitud de la sensación de dolor. Esta hipersensibilidad al dolor reduce el riesgo de daño tisular adicional y promueve la recuperación del tejido dañado, por lo que también se trata de un mecanismo adaptativo y protector. Sin embargo, en algunas situaciones este dolor no es reversible, como es el caso de la artritis reumatoide y otras patologías inflamatorias.

El **dolor neuropático** se corresponde con un estado doloroso anormal que se debe a la lesión o disfunción del sistema nervioso y se caracteriza por una falta de relación entre el estímulo y la sensación de dolor. Los mecanismos de modulación de las vías nociceptivas se encuentran alterados y se comportan de forma anómala, pudiendo generar una sensación de dolor ante estímulos inocuos e incluso dolor espontáneo. Por lo que se trata de un tipo de dolor totalmente patológico.

Esta clasificación neurobiológica ha sido aceptada a lo largo de los años. Sin embargo, más recientemente ha sufrido algunas modificaciones (Woolf, 2010). Los conceptos de dolor nociceptivo y dolor inflamatorio se mantienen, pero se añade el concepto de **dolor patológico**, que resulta del funcionamiento anormal del sistema nervioso y se divide en dos subtipos (figura 1). Por un lado, el dolor neuropático es aquel que se debe a un daño en el sistema nervioso y presenta las mismas características descritas anteriormente. Por otro lado, el **dolor disfuncional** es aquel que se produce en condiciones de dolor en las que no existe tal daño ni tampoco inflamación. Las afecciones que provocan este dolor disfuncional incluyen fibromialgia, síndrome del intestino irritable y otros síndromes en los que existe dolor sustancial, pero sin estímulos nocivos, y con patología inflamatoria periférica mínima o nula.

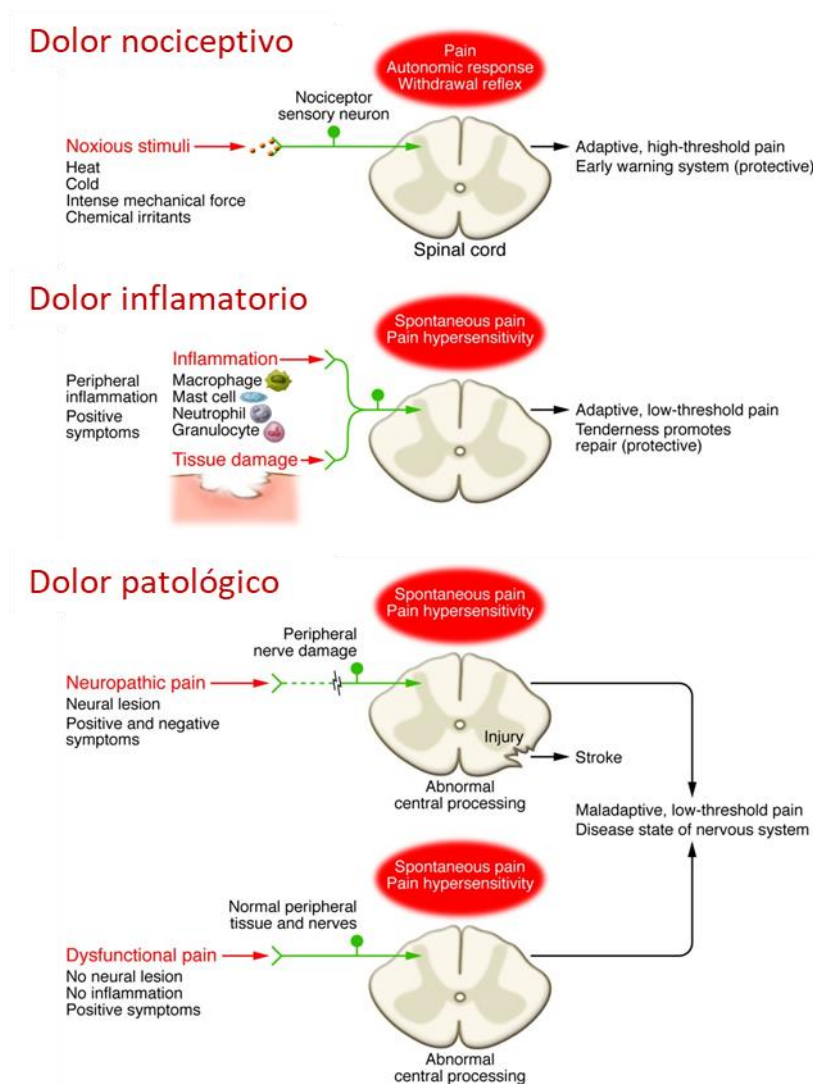


Figura 1. Clasificación funcional del dolor. El dolor nociceptivo representa la sensación asociada con la detección de estímulos nocivos potencialmente dañinos para los tejidos y tiene una función protectora. El dolor inflamatorio, también de carácter protector, se asocia con daño tisular. La hipersensibilidad generada ayuda a proteger la zona lesionada durante la curación de la lesión. El dolor patológico se produce por daños en el propio sistema nervioso (neuropático) o por un funcionamiento anormal (disfuncional). Modificado de Woolf (2010).

Por otra parte, una clasificación muy utilizada, sobre todo en clínica, se basa en la temporalidad del dolor. El **dolor agudo** se caracteriza por una aparición reciente y una duración limitada. Generalmente tiene una relación temporal y causal identificable a una lesión o enfermedad. Mientras que el **dolor crónico** persiste más allá del tiempo normal de curación de una lesión y puede que no haya ninguna causa claramente identificable. Por tanto, lo que define al dolor crónico no es sólo su carácter persistente, sino el hecho de que se mantenga a pesar de la completa curación de los tejidos. Según la IASP, se considera dolor crónico aquel que persiste o se repite durante más de tres meses (Treede y cols, 2019). En los síndromes de dolor crónico, el dolor puede ser el único síntoma o un síntoma principal y requiere un tratamiento y cuidados especiales. En afecciones como el dolor lumbar inespecífico, el dolor crónico puede concebirse como una enfermedad por derecho propio y según la última clasificación se denomina **dolor crónico primario**. En cambio, cuando el dolor es secundario a una enfermedad subyacente, como por ejemplo el dolor crónico relacionado con el cáncer, se conoce como **dolor crónico secundario**, donde al menos inicialmente puede ser concebido como un síntoma (Treede y cols, 2019).

1.2 Epidemiología del dolor

El dolor crónico constituye un problema de salud cuyo abordaje resulta prioritario por su frecuencia y repercusión en la calidad de vida de las personas que lo padecen. La encuesta *Pain in Europe* en 2006 determinaba que casi uno de cada cinco europeos había experimentado dolor crónico moderado o severo en el último mes y al menos dos veces por semana, con una proporción que variaba entre el 12 % en España hasta un 30 % en Noruega (Breivik y cols, 2006). Casi el 90% de las personas con dolor crónico lo habían experimentado durante más de dos años y un tercio de los pacientes no estaba recibiendo tratamiento. Encuestas poblacionales más actualizadas, que incluyen varios países europeos, estiman que entre un 25-35 % de los adultos reportan dolor crónico (Breivik y cols, 2013). En España, los datos más recientes indican que el dolor crónico afecta a un 17-18 % de la población y su intensidad se considera entre moderada e intensa en el 12 % de los casos. La lumbalgia inespecífica es la causa más frecuente de dolor, de manera que hasta un 80 % de la población la padece en algún momento de la vida (Caramés y Navarro, 2017; Torralba y cols, 2014). Los costes sanitarios y socioeconómicos del dolor crónico son elevados y se estiman entre un 3-10 % del producto interior bruto en Europa (Breivik y cols, 2013). Datos más recientes indican que en España supone entre un 2-2,8 % (Caramés y Navarro, 2017). Sin embargo, a pesar del gasto que supone, el tiempo medio para conseguir un tratamiento adecuado en España es de 1,6 años, ligeramente inferior a la media europea que son 1,9 años. Además, el 38 % de los europeos (29 % de los españoles) considera que no recibe el tratamiento adecuado para su dolor (Torralba y cols, 2014).

Estos datos demuestran que es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces y seguros para combatir algunas formas de dolor. El avance en el conocimiento de la organización y el funcionamiento de las vías nociceptivas junto con la investigación de los mecanismos de acción de los analgésicos existentes y el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas puede contribuir al desarrollo de fármacos que mejoren la calidad de vida de las personas.

Organización de las vías nociceptivas

Las vías nociceptivas están formadas por las estructuras del sistema nervioso que participan en la transmisión y el procesamiento de las señales nociceptivas. Los nociceptores periféricos se encargan de transmitir esta información desde la periferia (piel, músculos, articulaciones, vísceras) hasta el sistema nervioso central (SNC). La información nociceptiva se transmite a través de los nervios periféricos y alcanza la médula espinal o el núcleo trigémino (en el caso de la sensibilidad de la cara). Las neuronas sensoriales primarias hacen sinapsis con neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal, donde se produce la primera integración y procesamiento de la información nociceptiva. Desde la médula espinal, a través de vías ascendentes, esta información se envía a los núcleos ventral posterolateral, posterior e intralaminares del tálamo, donde se encuentran las neuronas de tercer orden. Finalmente, las neuronas tálamo-corticales proyectan sus axones a diferentes áreas corticales (corteza somatosensorial primaria y secundaria, corteza insular y corteza cingular anterior), donde se genera la sensación consciente de dolor.

2.1 Neuronas aferentes primarias

Las **neuronas aferentes primarias** están localizadas en los ganglios de la raíz dorsal (también en el ganglio trigémino en el caso de sensibilidad de la cara). Se trata de neuronas pseudounipolares cuyo axón se divide en una prolongación periférica que inerva los tejidos y una prolongación central que alcanza el SNC. Los axones de estas neuronas se denominan fibras aferentes primarias y forman parte de los nervios periféricos que transmiten la información desde los receptores periféricos hasta el SNC.

Las aferentes primarias varían en su calibre y pueden ser mielínicas o amielínicas, características que determinan diferentes velocidades de conducción. De esta manera, existen cuatro tipos principales de aferentes primarias (ver tabla 1). La nomenclatura de las aferentes primarias varía en función de la localización de los receptores sensoriales asociados, a pesar de que los axones tengan un calibre y velocidades de conducción similares. Las fibras que proceden de receptores cutáneos y viscerales se denominan fibras A β , A δ y C, mientras que los axones que inervan receptores de músculos y articulaciones son fibras de tipo I-IV.

Axones cutáneos/viscerales	Axones musculares	Calibre (μm)	Velocidad de conducción (m/s)	Mielinización	Receptores
	Tipo I	10 -20	72-120	Densa	Propioceptores
Fibras Aβ	Tipo II	5-15	20-100	Densa	Mecanorreceptores
Fibras Aδ	Tipo III	1-5	5-30	Ligera	Terminaciones libres
Fibras C	Tipo IV	0.5-2	0.4-2.5	Amielínicas	Terminaciones libres

Tabla 1. Características de las fibras aferentes primarias. Los valores de velocidades de conducción se corresponden con las aferentes primarias de gato, si bien el resto de las especies estudiadas presentan valores similares. Tomado de Willis y Coggeshal (2004).

Las fibras **tipo I** son las de mayor calibre y están altamente mielinizadas. Los nervios sensitivos de la piel carecen de este tipo de axones. Estas fibras conectan los husos musculares (fibras tipo Ia) y órganos tendinosos de Golgi (fibras tipo Ib) con el SNC. Las **fibras A β o tipo II** transmiten la información desde los mecanorreceptores cutáneos especializados (corpúsculos de Meissner, Pacini, Ruffini y células de Merkel) y los husos musculares, respectivamente. Por último, los receptores de las **fibras A δ y C** son terminaciones nerviosas libres y se encargan de transmitir información relacionada con la temperatura inocua, el prurito y la información nociceptiva.

No obstante, existen algunas excepciones. Una población de fibras C codifica sensaciones táctiles agradables o de “cosquilleo”. Estas fibras se describieron por primera vez en una preparación de nervio-piel de gato (Zotterman, 1939) y, posteriormente, se identificaron en la piel con pelo de varios mamíferos (para una revisión ver McGlone y cols, 2014). Se denominan mecanorreceptores C de bajo umbral (C-LTMR) en animales y aferentes C táctiles en humanos (Abraira y Ginty, 2013; McGlone y cols, 2014). También se han descrito fibras A δ no nociceptivas que están asociadas a los folículos pilosos y se denominan aferentes del pelo D o A δ -LTMR (Abraira y Ginty, 2013), además de algunas fibras A β que transmiten información nociceptiva (para una revisión ver Djouhri y Lawson, 2004).

Generalmente los nociceptores responden a un tipo de estímulo de alta intensidad, ya sea mecánico, térmico o químico, pero algunas fibras C son capaces de responder a diferentes modalidades de estímulo y se conocen como nociceptores polimodales (Cain y cols, 2001; Emery y cols, 2016). Además, existen los denominados nociceptores silentes, localizados sobre todo en las vísceras, pero también en la piel (Schmidt y cols, 1995). Normalmente estos receptores se activan cuando su umbral de activación disminuye considerablemente con la inflamación y diversas agresiones químicas.

Las fibras aferentes nociceptivas amielínicas se pueden dividir en diferentes grupos según sus propiedades neuroquímicas (Braz y cols, 2014; Todd y Wang, 2020). Por un lado, las **fibras C peptidérgicas** expresan diferentes neuropéptidos (CGRP, sustancia P y/o galanina). En rata, parece que el CGRP se expresa en todas estas aferentes. Aunque también se expresa en algunas aferentes mielínicas, se considera un buen marcador para localizar las terminales de las fibras C peptidérgicas en el asta dorsal de la médula espinal. Por otro lado, las **fibras C no peptidérgicas** carecen de estos neuropéptidos y se identifican por la expresión del receptor MrgprD y por su capacidad para unirse a la lectina vegetal IB4, el principal marcador utilizado para su localización. Varias evidencias indican que esta división tiene un componente funcional. Los nociceptores peptidérgicos inervan varios tejidos del cuerpo, incluidas las vísceras, y las capas más profundas de la piel. Además, expresan el receptor TRPV1, que responde a calor nocivo, y experimentos de ablación selectiva demuestran que son necesarios para la percepción del dolor por calor (Cavanaugh y cols, 2009). Por el contrario, los nociceptores no peptidérgicos inervan sobre todo la epidermis y son necesarios para la percepción del dolor mecánico (Cavanaugh y cols, 2009). También existen diferencias en cuanto al patrón de terminación de ambos tipos de aferentes en el asta dorsal de la médula espinal como se comentará posteriormente. Además, se ha descrito una subpoblación de fibras C que coexpresan somatostatina y polipéptido B natriurético, y otra que expresa receptores acoplados a proteínas G (MrgprA3/C11). Ambas poblaciones parecen estar implicadas en transmitir información de prurito (Han y cols, 2013; Huang y cols, 2018).

Todas las aferentes primarias ejercen una acción excitadora sobre las neuronas postsinápticas dado que el **glutamato** es el principal neurotransmisor que contienen. Sin embargo, existen diferencias respecto a la expresión de los transportadores de glutamato vesicular (VGLUT) entre los distintos tipos de aferentes primarias. Los mecanorreceptores de bajo umbral expresan el transportador VGLUT1, mientras que los nociceptores A δ y la mayoría de las fibras C expresan VGLUT2 (Todd y Wang, 2020). Por su parte, los C-LTMR expresan VGLUT3, que constituye el principal marcador para localizar sus terminales centrales en el asta dorsal de la médula espinal (Seal y cols, 2009). Las aferentes nociceptivas también utilizan algunos neuropéptidos (sustancia P y CGRP) como neurotransmisores. Algunas neuronas del asta dorsal expresan receptores para estos péptidos, destacando el receptor NK-1 de sustancia P.

Aunque la mayoría de las aferentes primarias muestran disposiciones sinápticas relativamente simples en el asta dorsal, algunas terminales forman los denominados **glomérulos sinápticos**. Son estructuras más complejas que involucran varias sinapsis y están constituidos por la terminal de la aferente primaria rodeada por varias dendritas y axones de otras neuronas y todo rodeado por procesos gliales. Los axones de las neuronas espinales suelen ser GABAérgicos y ejercen una regulación presináptica de las terminales de las aferentes primarias en su entrada a la médula espinal. Por su parte, las dendritas espinales generalmente son postsinápticas a la terminal de la aferente primaria, aunque algunas de estas dendritas también pueden formar sinapsis dendroaxónicas con la aferente (Todd y Wang, 2020).

2.2 Anatomía general de la médula espinal

La **médula espinal** forma parte del SNC y constituye el primer centro de relevo de la información somatosensorial que llega desde la periferia. La médula espinal de los vertebrados se encuentra en el canal medular de la columna vertebral. En el ser humano, se extiende desde el foramen magno hasta la primera o segunda vértebra lumbar, mientras que en la rata termina en la tercera vértebra lumbar y en el gato en la quinta. Sin embargo, en reptiles y aves ocupa toda la extensión del canal medular (Watson y Kayalioglu, 2009).

En sentido rostro-caudal, la médula espinal humana se divide en cuatro regiones con varios segmentos metaméricos: cervical (8), torácica (12), lumbar (5) y sacra (5), más un nivel coccígeo (ver figura 2). En cambio, la médula espinal de roedores consta de un total de 33-34 segmentos: ocho cervicales, trece torácicos, cinco o seis lumbares, cuatro sacros y tres coccígeos. En la médula espinal de los tetrápodos existen dos engrosamientos localizados en los segmentos encargados de inervar las extremidades. En la mayoría de los mamíferos, incluidos roedores y primates, el engrosamiento cervical se extiende desde el segmento C5 hasta el segmento T1, mientras que el engrosamiento lumbosacro se extiende de L2 a L6 en roedores y de L2 a S2 en humanos.

Los segmentos espinales cuentan con dos raíces dorsales y dos raíces ventrales, cada una de un lado del cuerpo. Las fibras aferentes primarias entran en la médula espinal a través de las raíces dorsales, mientras que los axones de motoneuronas somáticas y neuronas motoras del sistema nervioso autónomo salen de la médula espinal por las raíces ventrales para inervar los músculos y otros órganos. Cada raíz dorsal se fusiona con la raíz ventral del mismo lado del cuerpo para

formar los nervios espinales o raquídeos. Los nervios cervicales participan en la percepción sensorial y la función motora de la parte posterior de la cabeza, el cuello y las extremidades anteriores o superiores. Los nervios torácicos inervan la parte superior del tronco. Y los nervios lumbares y sacros inervan la parte inferior del tronco y las extremidades posteriores o inferiores.

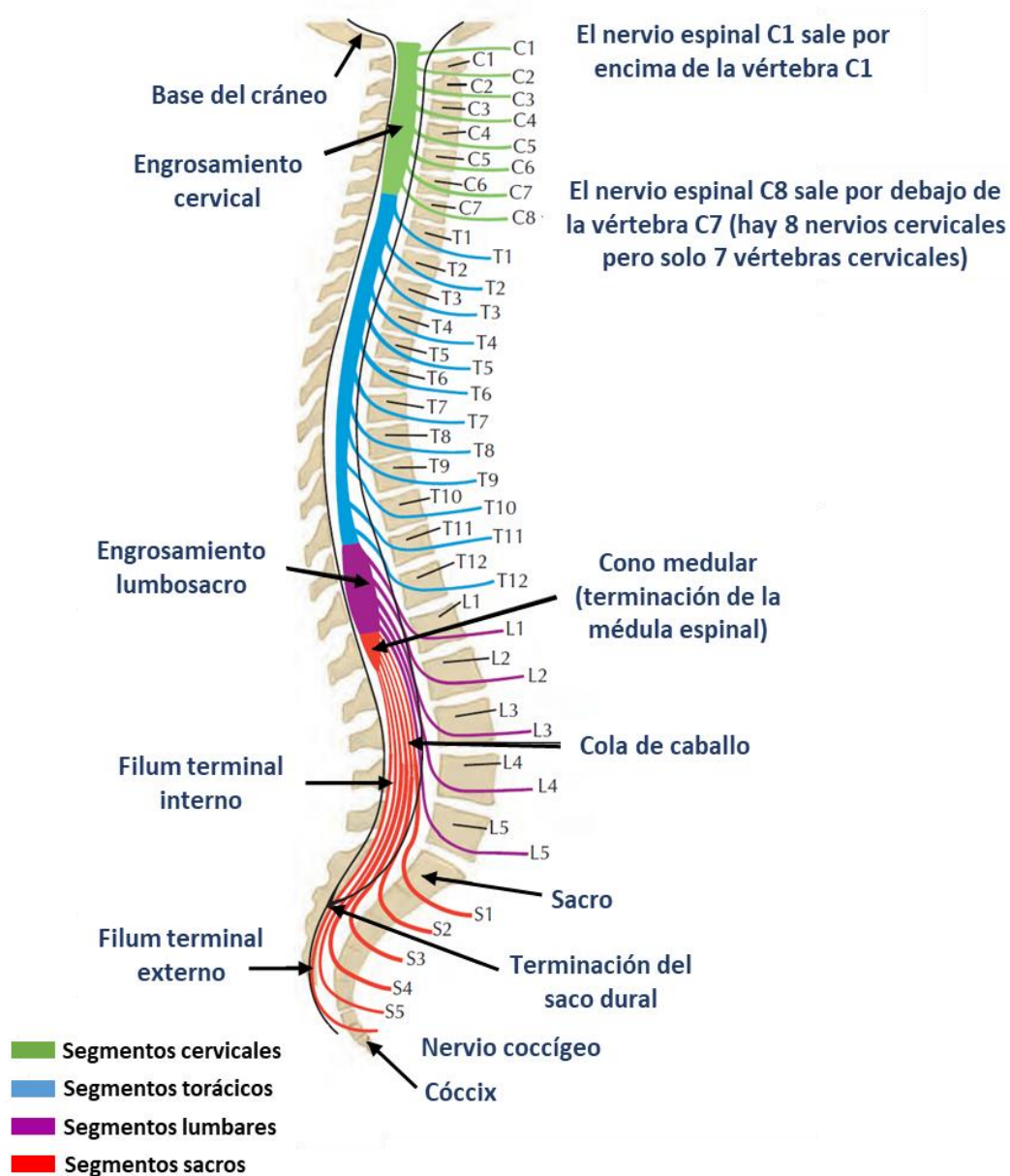
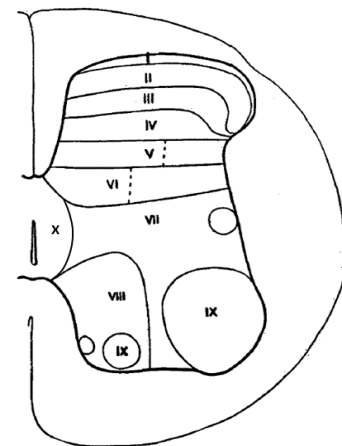


Figura 2. Organización segmental de la médula espinal humana. Se pueden observar las cuatro regiones diferentes en las que se divide la médula espinal: cervical, torácica, lumbar y sacra. Los engrosamientos cervical (C5-T1) y lumbosacro (L2-S2) reciben y procesan información de las extremidades superiores e inferiores, respectivamente. El final de la médula espinal se denomina cono medular, que en el ser humano se encuentra a la altura de la primera o segunda vértebra lumbar. Desde este punto, el saco dural contiene las raíces dorsales y ventrales de los segmentos L2 hasta el coccígeo, que en su conjunto forman la denominada cola de caballo. Los nervios espinales salen de la columna vertebral a través del foramen intervertebral en los segmentos vertebrales correspondientes al segmento espinal. Modificado de Felten y colaboradores (2010).

En una sección transversal de la médula espinal se observa una región externa de sustancia blanca y una región central de sustancia gris que tiene forma de H. La sustancia blanca está compuesta principalmente por axones, aunque también contiene células de la glía y vasos sanguíneos. Su color blanquecino se debe a la presencia de una gran proporción de fibras mielínicas. Estos axones forman las vías ascendentes, a través de las cuales la información sensorial llega hasta el encéfalo, y las vías descendentes, que portan las órdenes motoras y las influencias reguladoras procedentes del encéfalo. En cambio, la sustancia gris constituye la región de actividad sináptica donde se integra y se procesa la información sensorial que llega desde la periferia. Contiene los somas, axones y dendritas de las neuronas dentro de una matriz de glía y capilares. La comisura gris se encarga de unir la sustancia gris de ambos lados de la médula espinal y contiene el canal central por el cual circula el líquido cefalorraquídeo (Watson y Kayalioglu, 2009).

Rexed (1952; 1954) subdividió la sustancia gris de la médula espinal de gato en diez láminas en sentido dorso-ventral. Esta laminación ha sido aplicada a otras especies (Molander y cols, 1984; Molander y cols, 1989), incluido el ser humano. Las láminas I-VI forman el asta dorsal, las láminas de VII-IX constituyen el asta ventral y la lámina X rodea el canal central (figura 3). En los segmentos torácicos y lumbares superiores también existe un pequeño asta intermediolateral que contiene neuronas preganglionares simpáticas.

Figura 3. Esquema de una sección transversal de la médula espinal. Se pueden observar las láminas de Rexed en la sustancia gris. El asta dorsal incluye las láminas I-VI, que constituyen la porción sensorial de la médula espinal. El asta ventral está formada por las láminas VII-IX, donde están localizadas las motoneuronas y las interneuronas que modulan su actividad. La lámina X está formada por columnas de células agrupadas alrededor del canal central. Modificado de Rexed (1952).



2.3 Organización funcional de la médula espinal

De manera general, las neuronas de la médula espinal se clasifican en tres tipos principales atendiendo a su función. Las **neuronas de proyección** son aquellas cuyos somas se localizan en la médula espinal, pero proyectan sus axones para enviar la información a otros centros del sistema nervioso. Las **interneuronas** son las neuronas locales responsables de la integración y el procesamiento de la información que recibe la médula espinal. Por último, las **neuronas motoras** proyectan sus axones fuera del sistema nervioso central y se encargan de generar las respuestas motoras.

2.3.1 Asta dorsal de la médula espinal

Mediante registros de neuronas espinales y utilizando diferentes marcadores se han podido identificar las terminaciones centrales de las aferentes primarias, obteniendo los patrones anatómicos de distribución en el asta dorsal de la médula espinal (figura 4). Esta distribución depende en gran medida de las propiedades funcionales de los receptores sensoriales periféricos y determina las regiones de la médula espinal a las que van a llegar de forma directa las distintas submodalidades somatosensoriales.

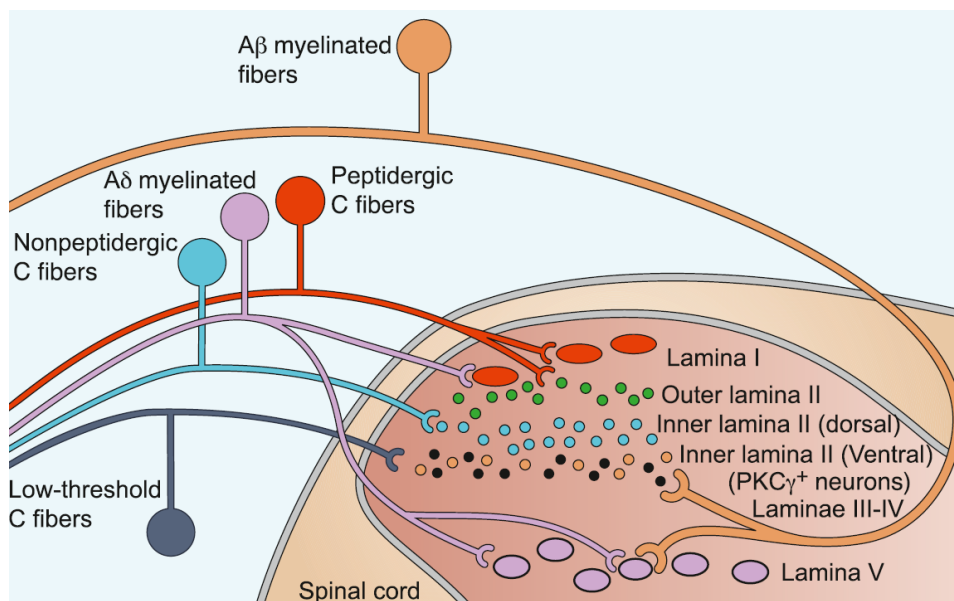


Figura 4. Patrón de terminación de las fibras aferentes primarias en el asta dorsal. Las fibras A β envían información procedente de los mecanorreceptores periféricos hasta neuronas de las láminas III-V. Por su parte, las fibras A δ alcanzan las láminas I y V, donde hacen sinapsis con interneuronas y/o neuronas de proyección que envían la información a los centros supraespinales. Por último, las fibras C terminan en las láminas superficiales I y II del asta dorsal y hacen sinapsis principalmente con interneuronas locales. La población de nociceptores amielínicos peptidérgicos termina específicamente en la lámina I y la región externa de la lámina II, mientras que los nociceptores no peptidérgicos se dirigen a la región interna de la lámina II. Los mecanorreceptores C de bajo umbral terminan en la parte más ventral de la región interna de la lámina II, justo en el borde con la lámina III. Hacen sinapsis sobre todo con una población de interneuronas que expresan la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKC γ). Tomado de Braz y colaboradores (2014).

Las aferentes A β se bifurcan cuando salen de la raíz dorsal y extienden sus ramas en sentidos opuestos a lo largo del eje rostro-caudal. A lo largo de este recorrido brotan colaterales que toman una trayectoria en forma de C antes de arborizar en las láminas III-V, donde hacen sinapsis con neuronas espinales. En cambio, otras colaterales ascienden directamente por la vía de las columnas dorsales hasta los núcleos de las columnas dorsales supraespinales (Abraira y Ginty, 2013). Por otro lado, los C-LTMR y los A δ -LTMR no se bifurcan cuando entran en la médula espinal, sino que viajan uno o dos segmentos en sentido rostral antes de arborizar en el asta dorsal, en concreto en la parte más ventral de la lámina II interna (Abraira y Ginty, 2013; Braz y cols, 2014).

Los nociceptores terminan generalmente en el asta dorsal superficial (láminas I y II). Las fibras A δ alcanzan la lámina I, pero también el asta dorsal profunda, sobre todo la lámina V. Los diferentes tipos de fibras C se diferencian en sus patrones de terminación en el asta dorsal. Mientras que las aferentes C peptidérgicas alcanzan la lámina I y capa externa de la lámina II, las aferentes C no peptidérgicas se dirigen a la capa interna de la lámina II. Esta distribución diferencial sugiere que existen distinciones funcionales de las neuronas sensoriales peptidérgicas y no peptidérgicas (Braz y cols, 2014).

Las neuronas del asta dorsal pueden clasificarse por su morfología somatodendrítica y esto se logró originalmente mediante tinción de Golgi (Gobel, 1978; Lima y Coimbra, 1986). Posteriormente, experimentos de registro de fijación de voltaje y su posterior reconstrucción anatómica, han permitido identificar una morfología más precisa de las células del asta dorsal. Se han descrito distintos tipos de neuronas entre los que se incluyen fusiformes, piramidales, radiales y verticales, entre otras (Grudt y Perl, 2002; Prescott y De Koninck, 2002).

Las neuronas sensoriales de la médula espinal también se han clasificado en base a los estímulos a los que responden (Cervero y cols, 1976; Handwerker y cols, 1975). Las neuronas de clase 1 o de **bajo umbral** se activan ante estímulos de baja intensidad cuya información llega desde los mecanorreceptores periféricos o los propioceptores a través de fibras gruesas mielinizadas. Las neuronas de clase 2 o de **amplio rango dinámico** responden a varias modalidades de estímulo, tanto mecánicos de baja intensidad como nocivos. Por último, las neuronas de clase 3 o **nociceptivas específicas** solo responden tras la activación de neuronas aferentes nociceptivas. Estas últimas a su vez han sido divididas en dos subclases por algunos autores (Cervero y cols, 1976). Las neuronas de clase 3a reciben solo información de nociceptores mecánicos A δ , mientras que las neuronas 3b reciben sinapsis de aferentes A δ y C, respondiendo a estímulos térmicos y mecánicos nocivos, además de por fibras musculares III y IV.

Más recientemente, se han encontrado ciertas relaciones entre la morfología de las neuronas y sus propiedades electrofisiológicas y funcionales que han permitido avanzar en el conocimiento de la organización de la médula espinal (Abraira y cols, 2017; Yasaka y cols, 2010).

Lámina I

La lámina I, también denominada **zona marginal**, es una capa delgada a través de la cual pasan numerosas fibras mielinizadas. Debido a esto puede resultar difícil identificar un límite claro entre la lámina I y la sustancia blanca que la recubre dorsalmente (Rexed, 1954). Las neuronas de la lámina I tienen un papel importante en el procesamiento de estímulos nocivos, térmicos y de prurito (Davidson y cols, 2012; Han y cols, 1998). Atendiendo a criterios histológicos se pueden dividir en tres poblaciones principales: neuronas fusiformes, piramidales y multipolares (Han y cols, 1998; Lima y Coimbra, 1986).

Las neuronas **fusiformes** son las más numerosas. Presentan somas longitudinales en forma de huso de cuyos extremos emergen árboles dendríticos bien desarrollados con numerosas espinas. Estas neuronas son nociceptivas específicas y se activan con estímulos mecánicos y térmicos nocivos (Han y cols, 1998). Las neuronas **piramidales** tienen cuerpos celulares

triangulares prismáticos de los cuales surgen unas pocas dendritas grandes que se ramifican dentro de la sustancia blanca. En la médula espinal de gato, Han y colaboradores (1998) demostraron que estas neuronas son termorreceptoras que responden al frío inocuo. Sin embargo, en médula espinal de rata parece que algunas neuronas piramidales expresan el receptor NK-1 de sustancia P y reciben una información específica de aferentes nociceptivas (Almarestani y cols, 2007; Todd y cols, 2002). Por último, las neuronas **multipolares** presentan un soma irregular del que brotan numerosos procesos dendríticos en diferentes direcciones. Son neuronas nociceptivas polimodales que responden a estímulos mecánicos, calor y frío, aunque algunas neuronas no responden a frío (Han y cols, 1998).

Registros electrofisiológicos de las neuronas de la lámina I han demostrado que existe cierta correlación entre la morfología de las células y sus patrones de disparo de potenciales de acción cuando se aplica una corriente despolarizante (Prescott y De Koninck, 2002). Las neuronas fusiformes son principalmente tónicas y disparan potenciales de acción durante todo el estímulo. Las neuronas piramidales son fásicas y disparan solo al principio del estímulo. En cambio, las neuronas multipolares muestran dos tipos de respuesta. Por un lado, una respuesta retardada, es decir, se produce un retraso desde que la neurona se despolariza hasta que dispara potenciales de acción; y, por otro lado, una respuesta de disparo único, caracterizada por el disparo de uno o unos pocos potenciales de acción al principio del estímulo.

La mayoría de las neuronas en el asta dorsal superficial son interneuronas (para una revisión ver Koch y cols, 2018). Sin embargo, en la lámina I, algunas neuronas (5-10 %) proyectan sus axones a través del sistema anterolateral hacia centros supraespinales. Las neuronas de proyección son generalmente más grandes que las interneuronas, un criterio que permite identificar ambos tipos neuronales (Al Ghamdi y cols, 2009). Alrededor de un 80 y 90% de las neuronas de proyección de lámina I expresan el receptor NK-1 en ratas y ratones, respectivamente. Sin embargo, no todas las neuronas que expresan el receptor NK-1 son neuronas de proyección, algunas interneuronas excitadoras también expresan este receptor, aunque a niveles más bajos (Todd y Wang, 2020). Entre las neuronas de proyección que no expresan el receptor NK-1 se ha identificado una pequeña población de neuronas multipolares gigantes. Estas neuronas presentan una alta densidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras, pero carecen de una entrada significativa de aferentes primarias (Polgár y cols, 2008).

Se han identificado neuronas de proyección de las tres poblaciones principales de neuronas, aunque la expresión del receptor NK-1 en las neuronas piramidales es considerablemente menor que en neuronas fusiformes y multipolares (Almarestani y cols, 2007). Estudios con diferentes animales, incluidos primates, han demostrado que la mayoría de las neuronas de proyección de la lámina I responden a estímulos nocivos, aunque algunas responden a frío inocuo y otras responden a histamina y parece que se encargan de transmitir información de prurito (Davidson y cols, 2012; Han y cols, 1998; Willis y cols, 1974; Zhang y Giesler, 2005). Además, la ablación de neuronas que expresan NK-1 en la lámina I previene el desarrollo de hiperalgesia en diferentes modelos de dolor (Mantyh y cols, 1997; Nichols y cols, 1999). Por lo tanto, las neuronas de proyección de la lámina I constituyen una vía fundamental de transmisión de la información nociceptiva desde la médula espinal hasta el encéfalo.

Los marcadores neuroquímicos han permitido identificar diferentes poblaciones de neuronas. Sin embargo, la mayoría de los marcadores identificados en la lámina I también se encuentran

en láminas más profundas (Koch y cols, 2018). Uno de los marcadores más estudiados es la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKC γ). En la lámina I, alrededor del 20% de las neuronas que expresan el receptor NK-1 también expresan la PKC γ , y generalmente presentan una morfología fusiforme (Polgár y cols, 1999). No obstante, la PKC γ también es un marcador característico de una población de neuronas que se encuentra en la lámina II interna, localizadas justo en el límite con la lámina III (ver a continuación).

Alrededor de un 90-95% de las neuronas de la lámina I son interneuronas, que se pueden dividir en dos clases principales en base a criterios funcionales. Las interneuronas excitadoras utilizan glutamato como neurotransmisor, mientras que las interneuronas inhibitoras utilizan GABA y/o glicina. En rata, cerca de un 25% de las neuronas de la lámina I son interneuronas inhibitoras. Todas estas neuronas expresan GABA y solo en algunas se observa marcaje para glicina, pero siempre coexpresado con GABA. Esto sugiere que algunas interneuronas inhibitoras liberan conjuntamente GABA y glicina, mientras que otras solo liberan GABA (Hughes y Todd, 2020). Las interneuronas espinales son anatómicamente y fisiológicamente heterogéneas y ha habido numerosos intentos de asignarlas a poblaciones funcionales específicas. Es esencial poder definir estas poblaciones, de modo que podamos investigar sus contribuciones a los circuitos sinápticos y sus roles en el procesamiento somatosensorial, incluida la información nociceptiva.

Las interneuronas de la lámina I también presentan fenotipos neuroquímicos compartidos con neuronas de láminas más profundas (Koch y cols, 2018), aunque se han determinado ciertos patrones. Por ejemplo, todas las interneuronas que expresan PKC γ son excitadoras, mientras que las neuronas que expresan dinorfina (DYN) no expresan PKC γ (Marvizón y cols, 2009). Todas las interneuronas inhibitoras del asta dorsal expresan el factor de transcripción Pax2, por lo que actualmente es el principal marcador que se utiliza para identificar a estas neuronas. Boyle y colaboradores (2017) identificaron cinco poblaciones definidas neuroquímicamente, en gran parte no superpuestas, que representan el 75% de las interneuronas inhibitoras en el asta dorsal superficial de ratón. Estos cinco grupos comprenden aquellas neuronas que expresan neuropéptido Y (NPY), óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), parvalbúmina (PV), calretinina (CR) y las que expresan conjuntamente galanina (GAL) y DYN.

Los avances recientes en la tecnología de secuenciación del ADN han permitido el análisis del transcriptoma de células individuales y la exploración de cómo los perfiles moleculares de las poblaciones neuronales están vinculados en su diversidad funcional y morfológica. En la médula espinal, varios estudios han definido grupos de neuronas en función de las combinaciones de genes que expresan. Häring y colaboradores (2018) describieron 15 clases de neuronas excitadoras y 15 clases de neuronas inhibitoras en el asta dorsal de ratón. Mientras que Sathyamurthy y colaboradores (2018) encontraron un número similar de neuronas excitadoras, pero solo nueve tipos de neuronas inhibitoras. Estas diferencias pueden deberse a las técnicas utilizadas. Häring y colaboradores (2018) realizaron una secuenciación de ARNm de toda la célula, mientras que Sathyamurthy y colaboradores (2018) realizaron una secuenciación nuclear. Algunas de estas poblaciones se corresponden particularmente bien con la clasificación neuroquímica anterior. Por ejemplo, entre las interneuronas inhibitoras, las poblaciones GAL/DYN⁺, NPY⁺, CR⁺ y PV⁺ identificadas en las láminas I-II parecen incluir, respectivamente, células en los grupos GABA 1-3, 5-7, 8-9 y 14 de Häring y colaboradores (2018). Estos estudios

suponen un avance importante y constituyen el camino a seguir para conocer en mayor profundidad la gran diversidad neuronal que existe en el asta dorsal de la médula espinal.

Varias de estas interneuronas están implicadas en la regulación de la información nociceptiva a nivel espinal. Gran parte de las células GAL⁺ y NPY⁺ son activadas por aferentes nociceptivas que expresan TRPV1, mientras que las células nNOS⁺ responden a nociceptores que carecen de TRPV1 (Polgár y cols, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que las interneuronas inhibitorias DYN⁺ están implicadas en un circuito que se encarga de regular el dolor frente a estímulos mecánicos (Duan y cols, 2014). Las diferencias en la respuesta a estímulos sugieren que estos marcadores revelan poblaciones de neuronas con funciones diferentes.

Sin embargo, estos marcadores no son exclusivos de las interneuronas inhibitorias, ya que algunos de ellos también se localizan en neuronas excitadoras y en aferentes primarias (Koch y cols, 2018). Las neuronas DYN⁺ constituyen una población muy heterogénea. En la lámina I de rata solo el 50% de neuronas DYN⁺ expresan también GABA (Sardella y cols, 2011). Además, este marcador también está presente en las terminales de algunas aferentes primarias (Marvizón y cols, 2009). Por otro lado, las neuronas inhibitorias CR⁺, que constituyen un 25% de las interneuronas inhibitorias en el asta dorsal superficial, solo representan un 15% del total de neuronas CR⁺. El resto se corresponde con una amplia clase de interneuronas excitadoras, localizadas sobre todo en la lámina II, y que también juega un papel importante en la modulación de la información nociceptiva (Peirs y cols, 2015; Petitjean y cols, 2019; Smith y cols, 2019).

Lámina II

Las características citoarquitectónicas más relevantes en la lámina II, conocida también como **sustancia gelatinosa**, son su alta densidad de neuronas de pequeño tamaño y la escasez de fibras aferentes mielinizadas que terminan en esta lámina. En diferentes especies de mamíferos, la lámina II se puede dividir en una zona externa y una zona interna (Molander y cols, 1984; Molander y cols, 1989; Rexed, 1954). La zona externa constituye aproximadamente un cuarto del total de la lámina II y contiene células ligeramente más pequeñas y más densamente empaquetadas que en la zona interna (Molander y cols, 1984; Rexed, 1954). Además, en roedores, en la lámina II interna se puede diferenciar una región dorsal y una ventral en base a determinados marcadores neuroquímicos y la terminación de aferentes primarias específicas. La lámina II también se caracteriza por un neuropilo denso donde destacan las sinapsis glomerulares (Heise y Kayalioglu, 2009).

Todas las neuronas descritas en la lámina II son interneuronas locales que se han estudiado ampliamente. El esquema de clasificación más aceptado es el desarrollado por Grudt y Perl (2002). En este trabajo combinaron registros electrofisiológicos con el posterior análisis morfológico e identificaron cuatro clases principales de neuronas que difieren en la morfología dendrítica: neuronas islote, centrales, verticales y radiales (figura 5). Además de los patrones de disparo descritos en la lámina I, las neuronas de la lámina II presentan dos patrones adicionales, el tipo GAP y el tipo reacio. El primero está caracterizado por un periodo silente posterior al primer disparo, seguido del resto de potenciales de acción. En cambio, las células de tipo reacio no disparan potenciales de acción tras la despolarización. Los patrones de disparo retardado, GAP y reacio están asociados con corrientes de potasio de tipo A (Yasaka y cols, 2010).

Yasaka y colaboradores (2010) relacionaron la morfología de las neuronas con la función que desempeñan en base a la expresión de diferentes neurotransmisores. Todas las células islote parecen ser inhibitorias, mientras que las células radiales y la mayoría de las células verticales son excitadoras. En cuanto a las células centrales, algunas son inhibitorias y otras excitadoras. En este trabajo también encontraron cierta relación entre los patrones de disparo y la función de las neuronas. La mayoría de las neuronas excitadoras muestran patrones de disparo asociados con la corriente de potasio I_A , ya sea retardado o de tipo GAP. Sin embargo, las neuronas inhibitorias rara vez muestran estos patrones (Yasaka y cols, 2010). Estos hallazgos sugieren que, aunque existe cierta correlación, ni la morfología ni el patrón de disparo pueden proporcionar un esquema de clasificación integral para las interneuronas de la lámina II. Más recientemente se ha intentado clasificar a las neuronas de la lámina II utilizando marcadores neuroquímicos (Koch y cols, 2018).

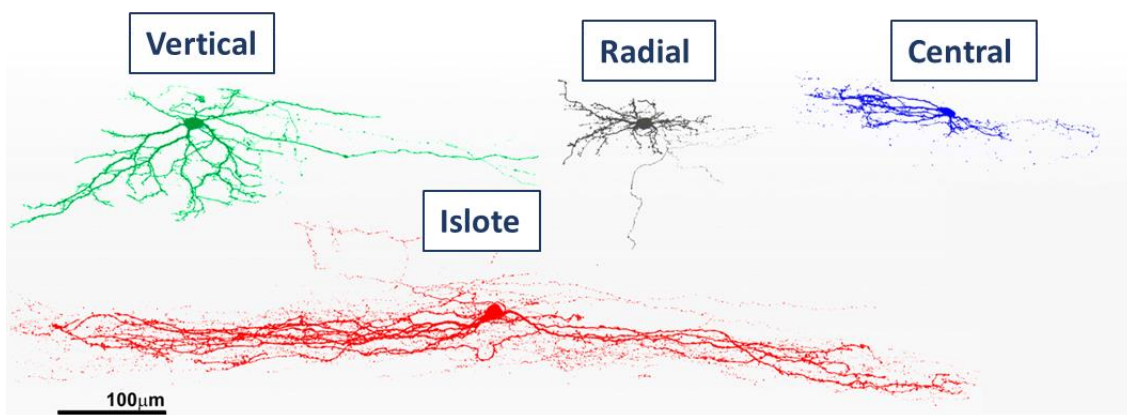


Figura 5. Clasificación morfológica de las neuronas de la lámina II. Ejemplos de las cuatro clases de interneuronas de la lámina II del asta dorsal en base a su morfología somatodendrítica, mostradas en cortes sagitales tras el marcaje con neurobiotina. Modificado de Peirs y colaboradores (2020).

A continuación, se describen con más detalle las características de cada una de las clases de neuronas de la lámina II.

Las **neuronas verticales** parece que se corresponden con las células limitantes o limítrofes descritas por primera vez por Ramón y Cajal (1895) y, posteriormente, denominadas como neuronas de tallo (Gobel, 1978). Son las neuronas más abundantes y se encuentran localizadas generalmente en la lámina II externa. Tienen ramificaciones dendríticas en forma de cono que se extienden ventralmente desde el soma y alcanzan la lámina III. Las células verticales reciben información de fibras A δ y C (Yasaka y cols, 2007) y hacen sinapsis directa con neuronas de proyección de la lámina I (Boyle y cols, 2019; Lu y Perl, 2005). Suelen mostrar un patrón de disparo tónico o retardado y la mayoría son excitadoras, aunque existe una pequeña población inhibitoria caracterizada por árboles dendríticos más pequeños y menos compactos (Yasaka y cols, 2010). En cuanto a la caracterización neuroquímica, se han descrito neuronas verticales excitadoras que expresan DYN (Huang y cols, 2018) y CR (Smith y cols, 2015). Boyle y colaboradores (2019) han definido un microcircuito que implica la participación de neuronas verticales de la lámina II y puede explicar la alodinia táctil característica en situaciones de dolor neuropático.

Las **neuronas radiales** muestran dendritas cortas y compactas que irradian en todas direcciones con una extensión mayor en el plano rostro-caudal. Los axones también son muy cortos y no se extienden fuera de la lámina II. Son células excitadoras y muestran un patrón de disparo retardado. Reciben información de aferentes A δ de manera indirecta a través de otras interneuronas, y de aferentes C de manera directa (Grudt y Perl, 2002; Yasaka y cols, 2007). Una subpoblación de las células PKCy⁺ de la lámina II interna presenta morfología radial (Alba-Delgado y cols, 2015). Más recientemente, Dickie y colaboradores (2019) demostraron que las neuronas excitadoras de la lámina II que expresan sustancia P también tienen morfología radial, la mayoría muestran un disparo retardado y juegan un papel importante en la transmisión de información nociceptiva.

Las **neuronas islote** tienen árboles dendríticos complejos que se extienden por la lámina II rostro-caudalmente. Todas las células islote parecen ser inhibitorias y muestran generalmente una respuesta tónica (Grudt y Perl, 2002; Yasaka y cols, 2010). Reciben sinapsis de aferentes primarias C de manera directa, y de aferentes A δ de manera indirecta a través de interneuronas inhibitorias (Grudt y Perl, 2002; Yasaka y cols, 2007). Estas células incluyen neuronas que expresan PV (Boyle y cols, 2019) y una población de neuronas inhibitorias CR⁺ (Smith y cols, 2015; Smith y cols, 2019). Las neuronas islote PV⁺ tienen sinapsis axoaxónicas con las terminales de aferentes A β y participan en el circuito descrito por Boyle y colaboradores (2019) que está implicado en la alodinia táctil. Es importante destacar que no todas las neuronas inhibitorias de la lámina II son neuronas con esta morfología.

Las **neuronas centrales** son similares a las células islote porque también tienen árboles dendríticos orientados rostro-caudalmente, aunque son de menor tamaño. Estas neuronas son muy heterogéneas. Presentan diferentes patrones de disparo que incluyen tónico y fásico, además de ser excitadoras e inhibitorias en proporciones similares (Grudt y Perl, 2002; Yasaka y cols, 2010). Reciben información de aferentes primarias C de manera directa e indirecta, a través de interneuronas inhibitorias, y de aferentes primarias A δ de manera indirecta (Yasaka y cols, 2007). Algunas neuronas excitadoras PKCy⁺ (Alba-Delgado y cols, 2015) y CR⁺ (Smith y cols, 2015) presentan morfología central.

Es importante destacar el papel de las **neuronas PKCy⁺**. Se trata de una población que forma una capa de células bien definida entre la zona ventral de la lámina II interna y la lámina III (ver figura 3) (Braz y cols, 2014). En la lámina II interna de rata se han definido dos subpoblaciones de neuronas PKCy⁺ en base a criterios morfológicos. Neuronas de morfología central, que en su mayoría muestran un patrón de disparo tónico, y neuronas radiales con diferentes patrones de respuesta en proporciones similares. Las dendritas de estas neuronas arborizan dentro de la lámina II interna, pero también se pueden extender hasta la lámina II externa o la lámina III, aunque no llegan a la lámina I (Alba-Delgado y cols, 2015). Sin embargo, en el asta dorsal de ratón las neuronas PKCy⁺ muestran una morfología similar a las células islote, con abundantes espinas dendríticas y un patrón de disparo retardado (Abraira y cols, 2017). El trabajo de Häring y colaboradores (2018) sugiere la existencia de distintas subpoblaciones de neuronas PKCy⁺. Identificaron hasta 15 subtipos moleculares de neuronas excitadoras en el asta dorsal de ratón, de las cuales siete expresan PKCy. Cada una de estas subpoblaciones puede desempeñar diferentes funciones en el asta dorsal.

Las neuronas PKC γ^+ reciben información de mecanorreceptores de bajo umbral de manera directa, pero también de manera indirecta a través de interneuronas inhibitorias (Lu y cols, 2013). La mayoría de aferentes primarias que alcanzan las neuronas PKC γ^+ son C-LTMR, en menor proporción A δ -LTMR y una minoría de fibras A β (Abraira y cols, 2017). Por lo que estas neuronas reciben información predominantemente táctil inocua. Las sinapsis excitadoras que reciben estas neuronas son en su mayoría de aferentes primarias (55%), de interneuronas locales (27%) y de neuronas de proyección descendente (18%).

Las neuronas PKC γ^+ pueden enviar sus axones a la lámina II externa, pero la mayoría permanecen en la lámina II interna (Alba-Delgado y cols, 2015). Lu y colaboradores (2013) demostraron que algunas neuronas centrales excitadoras de la lámina II son un objetivo importante de las neuronas PKC γ^+ . Estas neuronas centrales a su vez hacen sinapsis con las interneuronas verticales que envían sus axones a las neuronas de proyección de la lámina I. Por lo tanto, las neuronas PKC γ^+ tienen acceso a la red nociceptiva. En condiciones fisiológicas, existe una potente inhibición glicinérgica de las neuronas PKC γ^+ que evita que los mecanorreceptores de bajo umbral activen las vías nociceptivas. Sin embargo, esta inhibición se suprime en un modelo de dolor neuropático o cuando se bloquea la transmisión glicinérgica. De manera que la activación de fibras A β genera respuestas en las neuronas de proyección nociceptivas de la lámina I. Además, el bloqueo espinal de la transmisión sináptica glicinérgica *in vivo* genera una marcada alodinia mecánica (Lu y cols, 2013). Por lo que las neuronas PKC γ^+ son realmente importantes en los mecanismos de sensibilización central en la médula espinal y pueden explicar la alodinia en situaciones de dolor neuropático.

Un estudio posterior determinó que las **neuronas inhibitorias PV $^+$** pueden ser clave en la desinhibición de las neuronas PKC γ^+ en situaciones de neuropatía (Petitjean y cols, 2015). Estas neuronas se localizan en el borde entre la lámina II interna y la lámina III y establecen contactos sinápticos con las neuronas PKC γ^+ . Una lesión neuropática produce una reducción significativa de estos contactos. La ablación selectiva de neuronas PV $^+$ genera alodinia mecánica en ratones control, mientras que la activación de estas neuronas alivia la alodinia mecánica en ratones neuropáticos.

El importante papel de las interneuronas PV $^+$ en el desarrollo de la alodinia mecánica se ve reforzado por el trabajo de Boyle y colaboradores (2019). En este estudio sugieren que las neuronas de la lámina II que expresan PV están implicadas en segregar los circuitos de tacto y dolor para una percepción sensorial normal. Estas neuronas inhiben de manera presináptica las terminales de los mecanorreceptores de bajo umbral en la lámina III. Al mismo tiempo, ejercen una inhibición postsináptica de las neuronas verticales excitadoras de la lámina II. A su vez, las neuronas verticales extienden sus dendritas hacia la lámina III, donde reciben sinapsis de mecanorreceptores, y sus axones conectan directamente con las neuronas de proyección de la lámina I. En condiciones fisiológicas, las neuronas PV $^+$ inhiben la transmisión de la información táctil hacia las neuronas de proyección nociceptivas de la lámina I. Sin embargo, en condiciones de neuropatía o cuando se silencian selectivamente estas neuronas, se producen cambios funcionales de las interneuronas PV $^+$, permitiendo que la información táctil inocua active las neuronas de proyección nociceptivas de la lámina I a través de las interneuronas verticales excitadoras (Boyle y cols, 2019).

Estos microcircuitos pueden explicar algunos de los mecanismos que generan alodinia mecánica en pacientes que sufren dolor neuropático. La comprensión de los circuitos del asta dorsal subyacentes a la percepción sensorial resulta fundamental para el desarrollo de tratamientos eficaces contra el dolor crónico.

Lámina III

Las láminas más profundas no están tan bien caracterizadas como las láminas superficiales I y II. La lámina III contiene neuronas más grandes y están menos empaquetadas que las células de la lámina II (Rexed, 1954). Sin embargo, en la médula espinal de rata esta diferencia no está tan marcada y resulta más complicado apreciar el borde entre las dos láminas (Molander y cols, 1984; Molander y cols, 1989). Otra diferencia que distingue ambas láminas es la presencia de fibras mielinizadas en la lámina III. A nivel de estructura dendrítica, las neuronas de la lámina III se pueden clasificar en dos clases principales. Neuronas con árboles dendríticos que se extienden a lo largo del eje rostro-caudal y que permanecen en la lámina III, y neuronas con dendritas orientadas en el eje dorso-ventral y que generalmente se extienden hacia láminas superficiales. Estas últimas se denominan **neuronas antena** y están ampliamente distribuidas en el asta dorsal profunda (Heise y Kayalioglu, 2009; Willis y Coggeshall, 2004).

Aunque la mayoría de las neuronas de la lámina III son interneuronas locales, también contiene neuronas de proyección. Algunas de estas neuronas de proyección expresan el receptor NK-1 y generalmente son neuronas antena cuyas dendritas alcanzan las láminas superficiales. Las aferentes nociceptivas que llegan a las láminas superficiales hacen sinapsis con las dendritas de estas neuronas de proyección (Brown y cols, 1995; Marshall y cols, 1996), las cuales proyectan sus axones a través del sistema anterolateral y están implicadas en la transmisión de información nociceptiva (Marshall y cols, 1996). Además, estas neuronas también reciben sinapsis directas de aferentes mielinizadas (Naim y cols, 1998). Por lo tanto, estas neuronas de proyección responden tanto a estímulos nocivos como inocuos y se consideran de amplio rango dinámico. Este tipo de neuronas no es exclusivo de la lámina III, también están localizadas en láminas más profundas, sobre todo en la lámina V (Braz y cols, 2014). Sin embargo, la mayoría de las neuronas de proyección de la lámina III se encargan de transmitir información táctil y representan dos poblaciones principales: neuronas del tracto espinocervical y neuronas postsinápticas de las columnas dorsales (Abraira y Ginty, 2013; Willis y Coggeshall, 2004).

La morfología de las interneuronas del asta dorsal profunda es muy heterogénea. Se ha sugerido que algunas neuronas tienen morfologías similares a las neuronas descritas en la lámina II (Abraira y cols, 2017; Bourane y cols, 2015; Peirs y cols, 2015). Los patrones de disparo de las neuronas de la lámina III también son similares a los de la lámina II e incluyen respuestas tónicas, fásicas, retardadas, de disparo único, tipo GAP y reacias (Abraira y cols, 2017). Las interneuronas de la lámina III comparten la mayoría de marcadores neuroquímicos con las neuronas de las láminas superficiales y de láminas más profundas (Koch y cols, 2018), aunque algunos trabajos han descrito poblaciones de neuronas más o menos definidas y características de la lámina III.

Bourane y colaboradores (2015) definieron una población de interneuronas excitadoras que expresan el receptor nuclear $ROR\alpha$. Estas neuronas están innervadas selectivamente por mecanorreceptores cutáneos y son esenciales para procesar y transmitir información táctil. Además, forman parte de un circuito sensomotor espino-cerebeloso implicado en corregir comportamientos motores en respuesta a la retroalimentación sensorial táctil. Por otro lado, Peirs y colaboradores (2015) demostraron que la expresión transitoria durante el desarrollo del transportador de glutamato VGLUT3 define otra población de interneuronas excitadoras en la lámina III implicadas, en el desarrollo de alodinia mecánica en modelos de dolor neuropático e inflamatorio. Estas células reciben sinapsis directas de fibras aferentes de bajo umbral y extienden sus dendritas hacia láminas superficiales. A través de vías polisinápticas que involucran interneuronas de la lámina II ($PKC\gamma^+$ y CR^+) alcanzan las neuronas de proyección nociceptivas de la lámina I (figura 6).

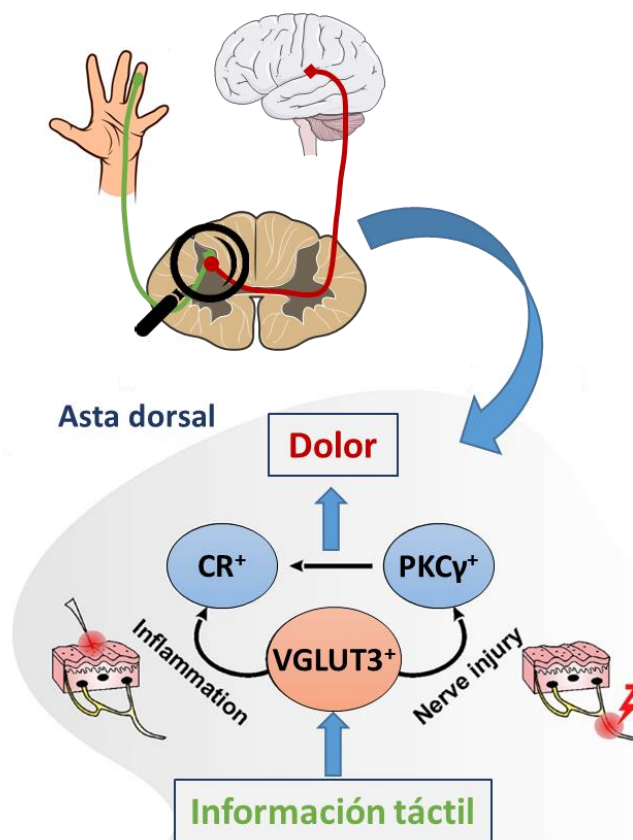


Figura 6. Esquema de un circuito del asta dorsal implicado en la alodinia mecánica. Las interneuronas excitadoras $VGLUT3^+$ de la lámina III reciben información táctil de aferentes primarias mielinizadas. Las interneuronas excitadoras $PKC\gamma^+$ y CR^+ de la lámina II reciben sinapsis de estas interneuronas de la lámina III. En condiciones fisiológicas, las interneuronas de la lámina II se encuentra inhibidas, sin embargo, cuando se produce una neuropatía o en situaciones de inflamación, se reduce la inhibición sobre las neuronas $PKC\gamma^+$ y CR^+ , respectivamente. En estas condiciones, la información de los mecanorreceptores alcanza los circuitos nociceptivos de las láminas superficiales del asta dorsal, incluidas las neuronas de proyección $NK-1^+$, que proyectan sus axones a los centros superiores. Modificado de Peirs y colaboradores (2015).

En las láminas III y IV, las interneuronas inhibitoras que utilizan glicina además de GABA como neurotransmisor, son más comunes respecto a las láminas superficiales (Hughes y Todd, 2020). Cui y colaboradores (2016) identificaron una población de interneuronas inhibitoras que se encuentra principalmente en la lámina III. Se caracterizan por la expresión del receptor de tirosina quinasa RET durante la etapa neonatal. Son morfológicamente heterogéneas y presentan un patrón de disparo generalmente tónico. Estas neuronas RET⁺ reciben información directa e indirecta de tacto y dolor. Al mismo tiempo ejercen una inhibición presináptica sobre aferentes A β y C, inhiben interneuronas excitadoras PKC γ ⁺ y también se inhiben entre sí. La activación de estas neuronas alivia el dolor neuropático e inflamatorio, mientras que la ablación selectiva muestra un efecto opuesto (Cui y cols, 2016). Por lo que parece que estas neuronas son fundamentales modulando la transmisión de la información nociceptiva en el asta dorsal de la médula espinal y sirven como un “interruptor” inhibitor entre las vías de tacto y dolor.

Un análisis genético más reciente ha identificado siete clases de neuronas excitadoras y cuatro clases de neuronas inhibitoras entre la lámina II interna y la lámina III, que se distinguen entre sí por combinaciones de propiedades morfológicas y fisiológicas, así como las sinapsis que reciben de diferentes aferentes primarias y neuronas cortico-espinales. Por ejemplo, las interneuronas inhibitoras que expresan cadherina-3 se caracterizan por su morfología radial, un patrón de disparo de tipo GAP, presentan pocas o ninguna espina dendrítica y reciben sinapsis abundantes de mecanorreceptores de fibras A β . Este análisis indica que estas clases de neuronas representan entre el 71-82% del total de neuronas de la región analizada (Abraira y cols, 2017) y supone un avance importante a la hora de clasificar las neuronas del asta dorsal.

Lámina IV

Las neuronas de la lámina IV presentan tamaños y formas muy diferentes. En base a la distribución de los árboles dendríticos existen tres tipos diferentes. Las ya mencionadas neuronas antena, que extienden sus dendritas en sentido dorsal, neuronas con árboles dendríticos transversales y neuronas con dendritas orientadas longitudinalmente. Las dendritas de las neuronas antena, como ocurre en la lámina III, alcanzan las láminas superficiales y reciben sinapsis de aferentes nociceptivas (Willis y Coggeshall, 2004).

Las neuronas de las láminas IV, V y VI pueden diferenciarse por la magnitud de su diseminación dendrítica, que es menor en las células de la lámina IV, intermedia para las células de la lámina V y mayor para las células de la lámina VI (Willis y Coggeshall, 2004). Una característica de las neuronas de la lámina IV es que tienen dendritas especialmente ricas en espinas (Heise y Kayalioglu, 2009). La lámina IV recibe sobre todo información de mecanorreceptores de bajo umbral y las neuronas de proyección envían sus axones a través del tracto espinotalámico y del sistema de las columnas dorsales.

Lámina V

La lámina V se caracteriza por la presencia de fibras mielínicas gruesas, sobre todo en la zona lateral, que muestra un aspecto reticulado cuando se observa en un corte transversal. La

reticulación divide la lámina V en una zona medial, con células pequeñas y más empaquetadas; y una zona lateral con células ligeramente más grandes y un gran número de fibras (Rexed, 1954). El tamaño de estas zonas varía entre especies. En la médula espinal de gato la zona lateral constituye alrededor de un tercio de la lámina V (Rexed, 1954), en cambio, en la médula espinal de rata son aproximadamente dos tercios (Molander y cols, 1984; Molander y cols, 1989).

Las células de la lámina V son más heterogéneas y de mayor tamaño que las células de la lámina IV (Molander y cols, 1984). Los campos dendríticos están más extendidos que en la lámina IV y no se observan dendritas con distribución longitudinal. Existe cierta correlación entre la morfología y la función de los distintos tipos neuronales. La lámina V destaca por la presencia de un gran número de neuronas de amplio rango dinámico que responden a estímulos inocuos y nocivos. Estas células son las más grandes y presentan un árbol dendrítico que se extiende en todas direcciones. También se han identificado neuronas nociceptivas específicas más pequeñas que las anteriores, pero con dendritas similares. Por último, las neuronas de bajo umbral son las más pequeñas y tienen árboles dendríticos menos extensos (Heise y Kayalioglu, 2009; Willis y Coggeshall, 2004).

Las aferentes primarias que llegan a la lámina V son principalmente fibras mielinizadas A β y A δ . Sin embargo, algunas neuronas que extienden sus dendritas hacia láminas superficiales reciben información de aferentes primarias C de manera indirecta. También llegan fibras del tipo III y IV procedentes de músculos y articulaciones. La mayoría de las neuronas de proyección en la lámina V están localizadas en la zona medial. Proyectan sus axones a diferentes regiones supraespinales, incluido el tálamo, núcleos de las columnas dorsales, núcleos cervicales laterales, formación reticular o cerebelo. En proporción existen más neuronas espino-talámicas que espino-cervicales o postsinápticas de las columnas dorsales. Además, muchas neuronas envían sus axones hasta las motoneuronas del asta ventral (Heise y Kayalioglu, 2009; Willis y Coggeshall, 2004).

Algunas poblaciones de interneuronas de las láminas más profundas del asta dorsal están integradas en circuitos relacionados con la modulación sensorial de la actividad motora. Un ejemplo son las interneuronas que expresan el marcador de desarrollo d13. Están localizadas en proporciones similares en las láminas V, VI y VII. Son neuronas premotoras que forman sinapsis excitadoras con motoneuronas y transmiten información de aferentes cutáneas de bajo umbral. Cuando se desactiva esta conexión con las motoneuronas, los ratones presentan deficiencias motoras en el agarre de la pata (Bui y cols, 2013).

Lámina VI

La lámina VI constituye la transición entre el asta dorsal y el asta ventral de la médula espinal, aunque en rata y gato solo está presente en los engrosamientos cervical y lumbosacro, zonas que reciben información de la extremidades (Molander y cols, 1984; Molander y cols, 1989; Rexed, 1954). Al igual que en la lámina V, se puede dividir en una zona medial y una zona lateral. En rata esta división solo se puede identificar en los segmentos lumbares L4-L6 (Molander y cols, 1984). Las células más pequeñas localizadas en la zona medial presentan morfología variable entre alargada, fusiforme o triangular, mientras que las células grandes suelen tener una forma

estrellada (Rexed, 1954). La distribución dendrítica es similar a la que se observa en la lámina V, pero las dendritas que se extienden dorsalmente no alcanzan las láminas superficiales.

Es la zona del asta dorsal donde llega menor número de aferentes primarias. Muchas aferentes primarias que se dirigen hacia el asta ventral emiten colaterales que alcanzan la lámina VI, sobre todo fibras propioceptivas. Se han descrito algunas neuronas que proyectan sus axones al cerebelo, pero la mayoría de las neuronas de la lámina VI son interneuronas con axones cortos que se proyectan localmente. Algunas de estas neuronas hacen sinapsis con motoneuronas del asta ventral y están involucradas en los reflejos motores espinales (Heise y Kayalioglu, 2009; Willis y Coggeshall, 2004).

2.3.2 Asta ventral de la médula espinal

El asta ventral de la médula espinal está constituida por las láminas VII, VIII y IX y tiene una función principalmente motora. La mayoría de las células de la lámina VII son interneuronas premotoras que proyectan sobre las motoneuronas de la lámina IX. En la mayoría de los mamíferos las vías motoras descendentes controlan las motoneuronas a través de la conexión con interneuronas de la lámina VII. También hay interneuronas que conectan núcleos motores de distintos segmentos de la médula espinal y, por tanto, implicadas en la comunicación intersegmental. En el borde lateral de la lámina VII, en los segmentos T1-L2 en humanos, está localizada el asta intermediolateral que contiene neuronas preganglionares simpáticas del sistema nervioso autónomo (Heise y Kayalioglu, 2009). El asta intermediolateral se extiende hasta el segmento L3 en rata (Molander y cols, 1984) y hasta L4 en gato (Rexed, 1954). Mientras que en la zona intermedia de los segmentos sacros S2, S3 y S4 se encuentran las neuronas preganglionares parasimpáticas. Las células de la lámina VIII también son principalmente interneuronas. Algunas de estas neuronas son comisurales y participan en la coordinación de la actividad motora entre los dos lados del cuerpo (Heise y Kayalioglu, 2009).

La lámina IX está formada por columnas de **motoneuronas**. Se trata de neuronas de tamaño relativamente grande que reciben información sensorial directa de aferentes primarias o vía indirecta a través de las interneuronas espinales. También reciben información descendente de los centros supraespinales para controlar los movimientos voluntarios. Por su parte, las motoneuronas proyectan sus axones fuera de la médula espinal para inervar los músculos del cuerpo. Cada motoneurona inerva fibras musculares de un único músculo (Heise y Kayalioglu, 2009).

En la médula espinal existe una relación ordenada entre la localización de las motoneuronas y los músculos que inervan, tanto en sentido longitudinal como medial-lateral. Esta disposición proporciona un mapa espacial de la musculatura del cuerpo. Las motoneuronas que inervan la musculatura axial, como son los músculos posturales del tronco, tienen una posición medial en la médula espinal. En cambio, los grupos de motoneuronas que inervan los músculos más distales de las extremidades se localizan en la región lateral del asta ventral (Heise y Kayalioglu, 2009; Purves y cols, 2008).

Existen varios tipos de motoneuronas en función de las fibras contráctiles que inervan. Las **motoneuronas α** inervan las fibras extrafusales del músculo esquelético y son las encargadas de la contracción muscular. Son las células más grandes de la médula espinal y suelen tener forma estrellada. Mientras que las **motoneuronas γ** son más pequeñas e inervan las fibras intrafusales de los husos musculares, los receptores sensoriales localizados en los músculos (Heise y Kayalioglu, 2009; Purves y cols, 2008).

Reflejos musculares

Los reflejos son movimientos automáticos y estereotipados en respuesta a la estimulación de receptores periféricos y que se integran y procesan en la médula espinal. En función del estímulo se desencadenan diferentes reflejos musculares (Purves y cols, 2008).

Reflejo de estiramiento o miotático. Incluye una única sinapsis entre una aferente primaria la y una motoneurona α , por lo que también se denomina reflejo monosináptico (figura 7). Se origina cuando el **huso muscular** es estimulado por el estiramiento del músculo. El huso muscular es una estructura encapsulada y alargada que contiene las fibras intrafusales dispuestas en paralelo con las fibras extrafusales que constituyen la masa del músculo. Las motoneuronas γ inervan los polos de estas fibras intrafusales, que constituyen la región contráctil del huso muscular. La región central del huso está inervada por aferentes primarias de tipo Ia y de tipo II que envían información a la médula espinal acerca de la longitud y tensión del músculo. El papel de las motoneuronas γ es ajustar la sensibilidad al estiramiento de los husos musculares para que estén siempre activos independientemente de la longitud del músculo. La estimulación de las aferentes primarias del huso debido al estiramiento del músculo activa las motoneuronas α y se produce la contracción muscular refleja.

Reflejo miotático inverso. Se produce por la activación de las aferentes primarias del **órgano tendinoso de Golgi**. El órgano tendinoso de Golgi es un receptor encapsulado que está localizado en la unión del músculo y el tendón. Cada órgano tendinoso está inervado por una única fibra aferente Ib. Cuando el músculo se contrae, la fuerza generada actúa de manera directa sobre el tendón, aumentando la tensión de las fibras de colágeno del órgano tendinoso y activando las aferentes Ib. Estas aferentes hacen sinapsis con interneuronas inhibitoras espinales que disminuyen la actividad de las motoneuronas α que inervan el mismo músculo. Se trata de un sistema de retroalimentación negativa que disminuye la contracción muscular cuando se produce una contracción excesiva y de esta forma protege al músculo. Además, este sistema también funciona en situaciones de fuerza muscular reducida. En estas condiciones tiende a mantener un nivel constante de fuerza, que contrarresta los efectos que disminuyen la fuerza muscular, como puede ser la fatiga del músculo.

Reflejo flexor o de retirada. Está mediado por circuitos polisinápticos más complejos (figura 7). Este reflejo se produce por la activación de nociceptores y conduce a la retirada del miembro de la fuente del estímulo por la excitación de los músculos flexores y la inhibición recíproca de los músculos extensores. En las extremidades inferiores la flexión de la extremidad estimulada se acompaña por una reacción opuesta en la extremidad contraria. En este caso se denomina **reflejo de extensión cruzada** y proporciona un soporte postural. Este reflejo de retirada se

puede utilizar para estudiar la nocicepción en varios test de comportamiento con animales y mediante aproximaciones electrofisiológicas como las que se han realizado en esta Tesis.

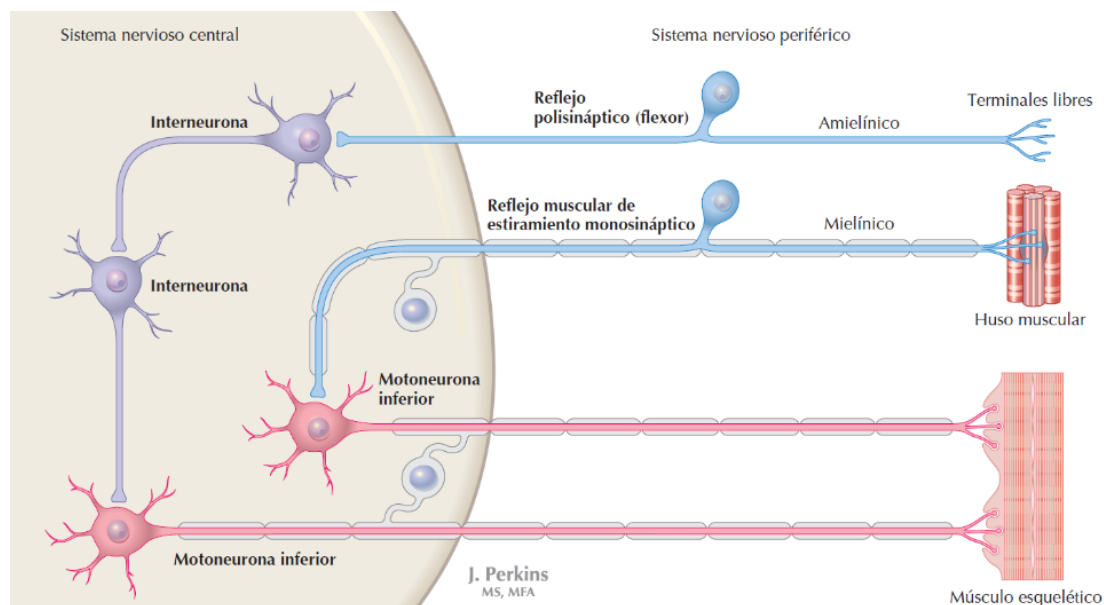


Figura 7. Representación esquemática de los reflejos musculares. En el reflejo de estiramiento la neurona aferente primaria que inerva el huso muscular hace sinapsis directamente con una motoneurona α , cuya activación produce la contracción del músculo. En cambio, el reflejo flexor se produce cuando se activan los nociceptores musculares y articulares e involucra varias interneuronas de la médula espinal. En este reflejo se contraen los músculos flexores y se inhiben los músculos extensores. Tomado de Felten y colaboradores (2010).

2.3.3 Vías ascendentes y descendentes

La médula espinal está conectada con los centros superiores en el encéfalo a través de vías ascendentes con funciones diferentes (figura 8). La vía de las **columnas dorsales** se encarga de transmitir la información de tacto discriminativo y la propiocepción hasta los centros superiores en el encéfalo. Está constituida por colaterales de las propias aferentes primarias (tipos Ia, Ib, II y A β) y axones de neuronas de proyección espinales de las láminas III, IV, y V. Estos axones están organizados de manera topográfica. Las fibras de los segmentos sacros ocupan una posición medial y a medida que ascendemos de nivel (hasta el segmento torácico T7) se van añadiendo fibras a los lados para formar el **fascículo grácil**. Las fibras torácicas a partir de T7 y las cervicales se sitúan lateralmente formando el **fascículo cuneiforme**. De manera que, los niveles inferiores de la médula espinal solo contienen fascículo grácil y, a partir del segmento T7, aparece el fascículo cuneiforme (Abraira y Ginty, 2013; Kayalioglu, 2009).

El tacto no discriminativo, la sensibilidad térmica no dolorosa y la sensibilidad nociceptiva ascienden a través de la médula espinal por haces de fibras que, en conjunto, forman el **sistema anterolateral**. Las neuronas espinales de segundo orden cruzan por la comisura blanca anterior y pasan al sistema anterolateral del lado contrario. Este sistema contiene fibras que alcanzan diferentes regiones encefálicas, siendo el haz **espinotalámico** la vía nociceptiva ascendente más

destacada. Las neuronas que contribuyen a formar esta vía están localizadas principalmente en las láminas I y V, cuyos axones ascienden por la médula espinal hasta los núcleos ventral posterolateral, posterior e intralaminares de tálamo. El sistema anterolateral también contiene un haz de fibras espinomesencefálicas y espinoreticulares que portan información nociceptiva hasta la sustancia gris periacueductal y el núcleo cuneiforme, entre otras zonas. Debido a las conexiones de alguno de estos centros con la amígdala, implicada en las emociones, se piensa que este haz espinomesencefálico contribuye de forma esencial al componente afectivo-emocional del dolor (Kayalioglu, 2009). En cuanto a la información nociceptiva visceral, varios trabajos indican que asciende por el sistema de las columnas dorsales (Nauta y cols, 1997; Wang y cols, 1999).

Los tractos **espinocerebelosos** dorsal y ventral están localizados en la superficie lateral de la médula espinal y transmiten información propioceptiva implicada en la coordinación motora. En humanos, las fibras del tracto espinocerebeloso dorsal se originan en el núcleo dorsal, localizado en lámina VII de los segmentos espinales T1-L3. Por su parte, las fibras del tracto espinocerebeloso ventral proceden principalmente de neuronas del asta ventral de los segmentos lumbosacros.

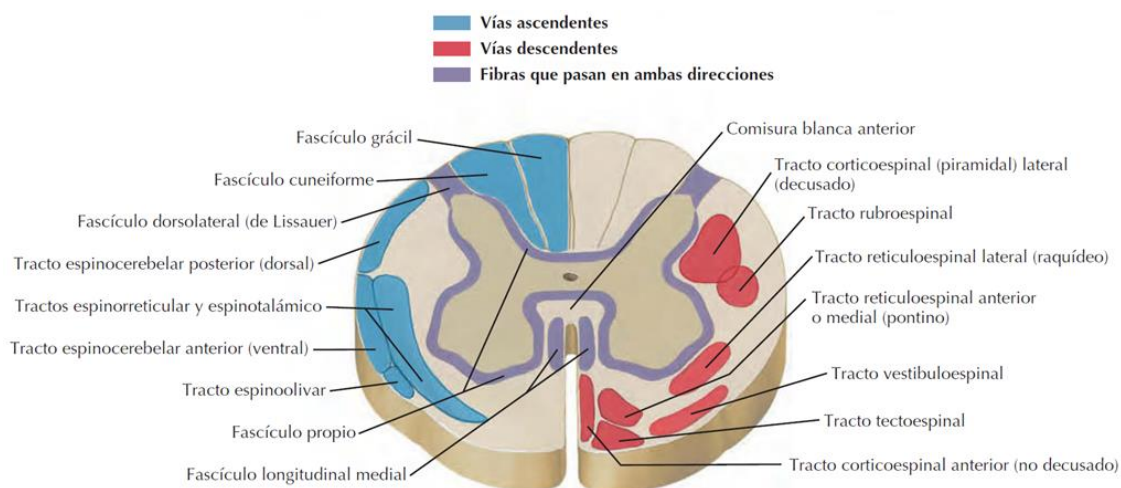


Figura 8. Esquema de las vías ascendentes y descendentes de la médula espinal. Sección transversal de la médula espinal donde están representados los principales tractos ascendentes y descendentes. Tomado de Felten y colaboradores (2010).

Además, existen vías descendentes que ejercen un control de los circuitos espinales por parte de los centros superiores. Algunas de estas vías están encargadas de modular la información nociceptiva en el asta dorsal e incluyen varios sistemas de neurotransmisores. En esta regulación están implicadas diferentes estructuras supraespinales, como son la corteza somatosensorial, la amígdala, la sustancia gris periacueductal, la región reticular ventrobulbar (RVB) y el locus coeruleus. La activación de este sistema analgésico endógeno tiene un efecto directo en la integración de la información nociceptiva en el asta dorsal (Ossipov y cols, 2010).

La vía bulboespinal **serotoninérgica** se origina en la región RVB, que incluye el núcleo magno del rafe y el núcleo paragigantocelular de la formación reticular. A su vez, las neuronas de estos núcleos están altamente reguladas por las neuronas de la sustancia gris periacueductal. Las

neuronas de la región RVB proyectan sus axones hacia la médula espinal a través del **funículo dorsolateral** y terminan principalmente en el asta dorsal, sobre todo en las láminas I, II y V (Ossipov y cols, 2010; Watson y Harvey, 2009). Los efectos de la serotonina pueden ser excitadores o inhibidores dependiendo del subtipo de receptor que expresen las neuronas espinales. Este sistema serotoninérgico es un importante modulador de la transmisión nociceptiva en el asta dorsal. Sin embargo, se ha demostrado que en rata solo un 20 % de las neuronas de la región RVB que proyectan al asta dorsal son serotoninérgicas, mientras que el resto son GABAérgicas o glicinérgicas (Kato y cols, 2006; Ossipov y cols, 2010).

La vía descendente **noradrenérgica** también forma parte del sistema analgésico endógeno y tiene su origen en el locus coeruleus, cuyas neuronas están comunicadas con la sustancia gris periacueductal y la región RVB. Las neuronas del locus coeruleus proyectan sus axones por el **funículo ventral** ipsilateral y finalizan principalmente en el asta dorsal (Watson y Harvey, 2009). La noradrenalina ejerce una fuerte inhibición de la transmisión nociceptiva espinal mediante la activación de los receptores α 2-adrenérgicos. A nivel presináptico, se reduce la liberación de neurotransmisores excitadores desde las terminales de las aferentes primarias y, a nivel postsináptico, hiperpolariza a las neuronas del asta dorsal. Por el contrario, la activación de los receptores α 1-adrenérgicos aumenta las respuestas de las neuronas espinales a las entradas nociceptivas, aunque la activación de las neuronas GABAérgicas que expresan estos receptores puede contribuir a la inhibición de la información nociceptiva (Ossipov y cols, 2010).

Por otro lado, el **sistema corticoespinal** constituye la vía principal de control motor. Tiene su origen principalmente en la corteza motora primaria y la corteza premotora. Los axones de estas neuronas descienden hasta la unión bulboespinal, donde la inmensa mayoría cruza la línea media en la decusación motora, y terminan en la médula espinal. Estas fibras presentan una organización topográfica. Los axones que alcanzan los segmentos cervicales son los más mediales, mientras que los que se distribuyen los por segmentos lumbares y sacros son los más laterales. A medida que las fibras mediales entran y terminan en la sustancia gris medular, los fascículos más laterales adyacentes se van desplazando hacia la línea media. La mayoría de las fibras corticoespinales hacen sinapsis con interneuronas excitadoras e inhibitoras de las láminas V-VII que participan en la modulación de las motoneuronas (Watson y Harvey, 2009).

Las fibras **rubroespinales** también intervienen en el control motor y tienen su origen en el núcleo rojo del mesencéfalo. Descienden a la médula espinal junto con las fibras corticoespinales laterales y terminan principalmente en los engrosamientos cervical y lumbosacro. En general, estas fibras estimulan a las motoneuronas que inervan músculos flexores e inhiben a las motoneuronas que inervan músculos extensores (Watson y Harvey, 2009).

Canales de potasio

Los **canales de potasio** constituyen el grupo más numeroso y heterogéneo de canales iónicos. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células. El genoma humano contiene alrededor de 80 genes que codifican para canales de potasio. Muchos de estos genes, además, presentan variantes postranscripcionales y experimentan ensamblaje multimérico, lo que aumenta de manera considerable el número de configuraciones de canales de potasio funcionales (González y cols, 2012; Miller, 2000).

Los canales de potasio son responsables de numerosas funciones para la fisiología celular. Mantienen el potencial de membrana y regulan la excitabilidad celular. La apertura de estos canales genera un flujo de salida de iones potasio y la consiguiente repolarización de la célula, que finaliza el potencial de acción en las células excitables. Además, están implicados en otras respuestas fisiológicas, como la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la secreción de hormonas como la insulina (Blunck y Batulan, 2012; Miller, 2000).

La Unión Internacional de Farmacología ha propuesto una nomenclatura estandarizada para los canales de potasio en base a su estructura y sus relaciones filogenéticas (ver figura 9) (Gutman y cols, 2005). De esta manera los canales de potasio se clasifican en tres tipos principales:

Canales con 6-7 dominios transmembrana y un segmento formador de poro (6-7TM/1P). En este grupo se incluyen los canales de potasio **dependientes de voltaje** (K_v), los más numerosos e importantes en el control de la excitabilidad neuronal (Gutman y cols, 2005). La estructura y función de los canales K_v se explicará con mayor profundidad más adelante.

Los canales de potasio **activados por calcio** (K_{Ca}) de conductancia pequeña (SK) e intermedia (IK) también presentan seis dominios transmembrana. Estos canales se activan por el Ca^{2+} detectado a través de calmodulina, que se encuentra unida constitutivamente al extremo C-terminal. Los canales K_{Ca} ($K_{Ca3.1}$) y SK ($K_{Ca2.1-3}$) juegan un papel importante en varios procesos celulares que dependen de señales de calcio, tanto en células excitables como no excitables (Wei y cols, 2005). La corriente hiperpolarizante I_{AHP} mediada por canales K_{Ca} participa en la repolarización neuronal después del potencial de acción en varios tipos neuronales de la médula espinal, incluidas las motoneuronas (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998).

Con un segmento transmembrana adicional, el grupo 7TM/1P, está formado por los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BK) o Slo ($K_{Ca1.1}$, $K_{Ca4.1}$, $K_{Ca4.2}$, $K_{Ca5.1}$), que se activan por la unión directa de calcio intracelular en el extremo C-terminal. El poro se encuentra entre el segmento transmembrana 6 y 7 y difiere de otros canales en que la región N-terminal es extracelular (Wei y cols, 2005). Los canales BK regulan la forma, la frecuencia y la propagación de los potenciales de acción, así como la liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas en los circuitos neuronales de encéfalo y médula espinal. También proporcionan un mecanismo de retroalimentación negativa durante los aumentos locales de la concentración de calcio intracelular (Contet y cols, 2016).

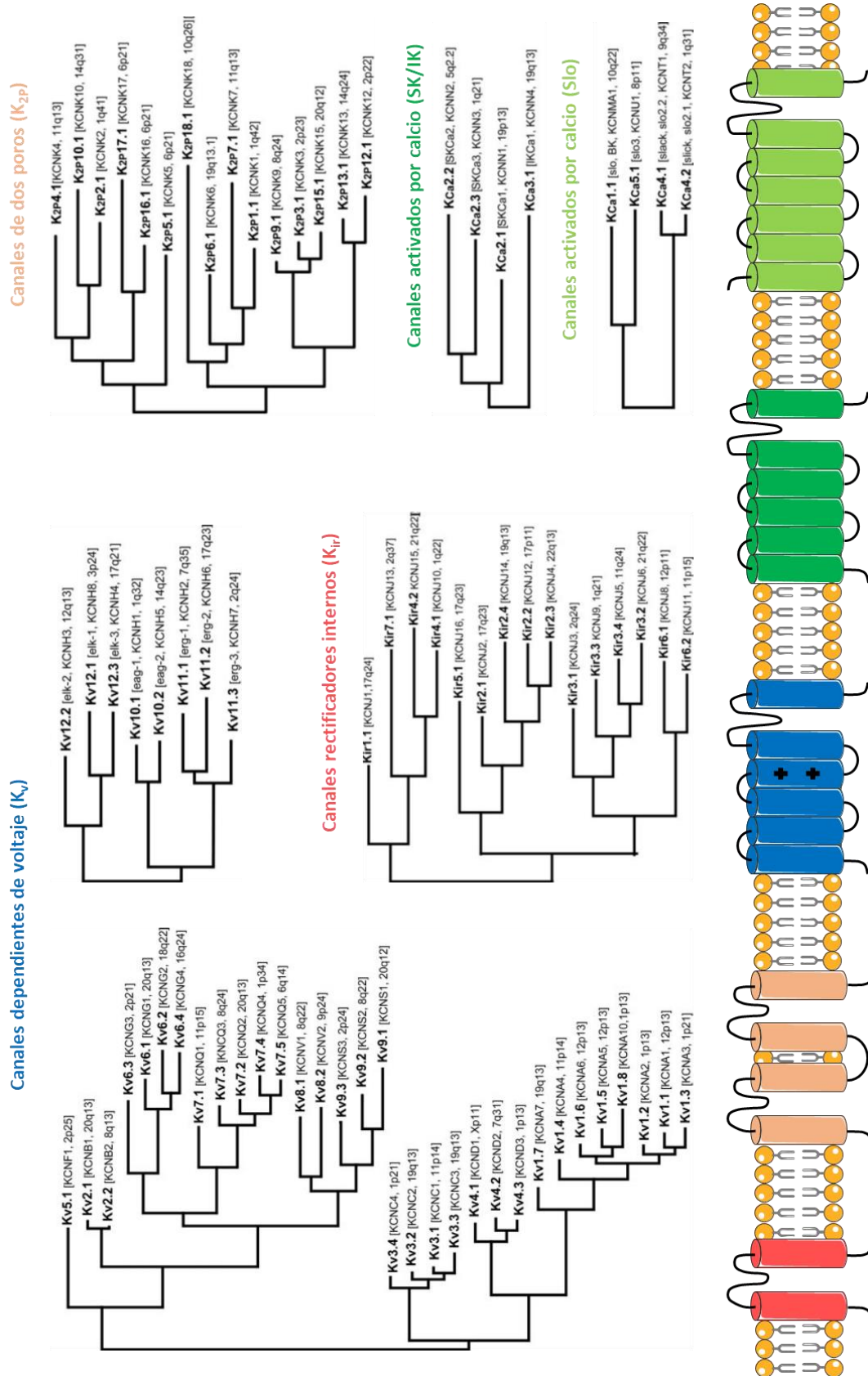


Figura 9. Clasificación estructural y filogenética de los canales de potasio. Modificado de Gutman y colaboradores (2005), Wei y colaboradores (2005), Kubo y colaboradores (2005), Goldstein y colaboradores (2005).

Canales con dos dominios transmembrana y un segmento formador de poro (2TM/1P). Este grupo está formado exclusivamente por los canales de potasio **rectificadores internos** (K_{ir}), que incluyen los canales activados por ATP y los canales acoplados a proteínas G (GIRK). El poro de estos canales se encuentra entre los dos segmentos transmembrana (M1 y M2) y los extremos N y C-terminales son intracelulares. Los canales K_{ir} funcionales se forman por la unión de cuatro subunidades. Estos canales juegan un papel fisiológico importante en el sistema nervioso, corazón, riñones, células endocrinas, entre otros (Kubo y cols, 2005). En concreto, los canales GIRK1 y GIRK2 se expresan en neuronas nociceptivas de ganglio de la raíz dorsal y de la médula espinal (Lyu y cols, 2015; Marker y cols, 2006), y en condiciones de neuropatía se reducen los niveles de expresión de estos canales (Lyu y cols, 2015).

Canales con cuatro dominios transmembrana y dos segmentos formadores de poro (4TM/2P). Los miembros de esta familia se denominan **canales K_{2P}** . Presentan dos segmentos formadores de poro en cada subunidad y se ensamblan como dímeros, con sus extremos N y C-terminales intracelulares. En función de sus características estructurales y funcionales estos canales se clasifican en seis subfamilias: TWIK, TREK, TASK, THIK, TALK y TRESK. Los canales K_{2P} normalmente se encuentran constitutivamente abiertos y son responsables de las corrientes de fuga o “leak” que mantienen el potencial de reposo celular. Están regulados por diversos parámetros fisicoquímicos como el pH, la temperatura, distensión mecánica o ácidos grasos insaturados (Goldstein y cols, 2005). Los canales TASK-1 y TASK-3 se expresan en neuronas de ganglio de la raíz dorsal y de la médula espinal y tienen un papel importante en la transmisión de información nociceptiva (García y cols, 2019). También se han encontrado en levaduras canales de potasio con dos poros, pero con ocho segmentos transmembrana 8TM/2P (Goldstein y cols, 2005).

3.1 Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales K_v forman el grupo más amplio y diverso de canales de potasio. Tras el clonaje del canal Shaker en *Drosophyla melanogaster* (Papazian y cols, 1987) se identificaron otras tres familias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales K_v a las que se denominó Shab, Shaw y Shal. Estos cuatro grupos se corresponden con las familias K_v1 (Shaker), K_v2 (Shab), K_v3 (Shaw) y K_v4 (Shal) en mamíferos. En mamíferos se expresan un total de doce familias diferentes (K_v1-12), con una homología aminoacídica de alrededor del 70% dentro de una misma familia y del 40% entre diferentes familias (González y cols, 2012; Gutman y cols, 2005).

Además, varios factores determinan la diversidad funcional de los canales K_v . En primer lugar, la capacidad de formar **heterotetrámeros**. Los canales K_v funcionales están formados por cuatro subunidades α que pueden ensamblar como homotetrámeros (cuatro subunidades iguales), o como heterotetrámeros entre las diferentes subunidades de una misma familia, como es el caso de los canales K_v1 , K_v7 y K_v10 . Se ha demostrado que la heterotetramerización modifica ciertas propiedades de estos canales, como las cinéticas de apertura/cierre, la regulación a la que están sometidos, la sensibilidad al voltaje y la expresión en la membrana plasmática (Christie y cols, 1990; Covarrubias y cols, 1991; Gutman y cols, 2005). Un segundo factor son las subunidades

modificadoras, también denominadas **subunidades silentes**. Los miembros de las familias K_v5 , K_v6 , K_v8 y K_v9 no forman canales funcionales por sí solos, sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades de los canales K_v2 y K_v3 , aumentando la diversidad funcional dentro de estas familias. La interacción con diferentes **proteínas accesorias** también modifica determinadas propiedades de estos canales, como la apertura, la expresión o el transporte a la membrana. Estas subunidades también sirven como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos o endógenos. Las subunidades $K_v\beta$ (1-3) son proteínas intracelulares que se unen a la subunidad α de las familias K_v1 , K_v2 y K_v4 a través del extremo N-terminal. Esta interacción parece que estabiliza la expresión de los canales en la membrana además de inducir una inactivación más rápida (Aimond y cols, 2005; Heinemann y cols, 1996; Rettig y cols, 1994). Otro tipo de proteínas accesorias son las codificadas por los genes KCNE1-5. La proteína mink (KCNE1) se asocia con la subunidad $K_v7.1$ generando la corriente I_{Ks} en el corazón. Esta asociación modifica en gran medida la sensibilidad a determinados fármacos de los canales $K_v7.1$ (Wang y cols, 2000). Por último, otros factores importantes son el **empalme alternativo** del ARNm, que genera isoformas diferentes a partir de la expresión de un mismo gen, y las **modificaciones postraduccionales** mediante fosforilación, ubiquitinación o palmitoilización que también modifican la función de los canales K_v .

3.1.1 Estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales K_v se ensamblan como tetrámeros simétricos de subunidades α . Cada subunidad α consta de seis segmentos transmembrana, denominados S1-S6 de acuerdo con su localización respecto al extremo N-terminal, conectados por cinco regiones de enlace (figura 10). Los extremos N y C terminales se orientan hacia el interior celular. El complejo S1-S4 constituye el sensor de voltaje y la secuencia que conecta los segmentos S5 y S6, denominada región P, forma el poro conductor de iones potasio en el centro de la estructura.

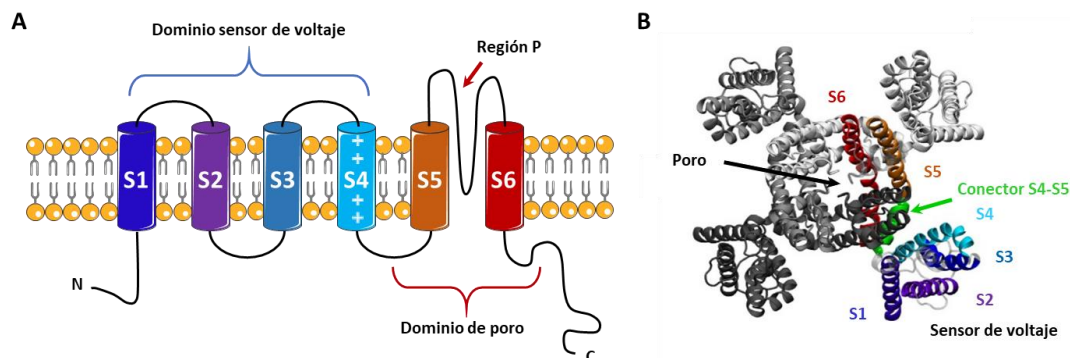


Figura 10. Estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje. (A) Las subunidades α de los canales K_v están formadas por seis segmentos transmembrana (S1-S6). El dominio de sensor de voltaje está constituido por los segmentos S1-S4, incluyendo el S4 cargado positivamente. Mientras que el dominio de poro lo forman los segmentos S5 y S6 junto con la región P que los une. (B) Estructura de un canal K_v vista desde arriba. Cuatro subunidades α se ensamblan para formar un canal funcional, quedando el poro en el centro de la estructura. Modificado de Fowler y Sansom (2013).

Estas subunidades α pueden estar acompañadas por proteínas auxiliares que intervienen en la modulación de la actividad del canal y en la correcta expresión del canal en la superficie de la membrana (González y cols, 2012).

Sensor de voltaje

Una de las principales características de los canales K_v es la capacidad de detectar los cambios de voltaje que se generan entre ambos lados la membrana. Estos canales son capaces de acoplar esta señal eléctrica a su mecanismo de apertura y cierre. El segmento S4 contiene aminoácidos con carga positiva (arginina/lisina) y su desplazamiento en respuesta a variaciones en el campo eléctrico produce un cambio conformacional en el poro del canal (Bezanilla, 2002). En este proceso existe una corriente transitoria previa a la conducción de iones por parte del canal, la denominada corriente de apertura o "gating current", la cual se relaciona con el movimiento de cargas del propio canal durante la apertura (Armstrong y Bezanilla, 1973; Stefani y cols, 1994).

Se han propuesto varios modelos diferentes respecto al movimiento del sensor de voltaje. En el modelo tradicional el segmento S4 sufre una rotación y un desplazamiento hacia arriba, que genera una translocación de cargas y un cambio conformacional que conduce a la apertura del poro (Bezanilla, 2002). Sin embargo, Jiang y colaboradores (2003) propusieron otro modelo que implica grandes desplazamientos del sensor de voltaje a través de la membrana. En este trabajo presentaron la estructura cristalina del canal K_vAP de la bacteria *Aeropyrum pernix*, un canal que tiene una estructura similar a otros canales K_v . Plantearon que en reposo el segmento S4 se encuentra en paralelo y localizado en la cara interna de la membrana. Cuando se produce una despolarización, las argininas cargadas (situadas en un extremo) se desplazan a través de la membrana lipídica y se colocan en la superficie externa del canal, quedando el segmento S4 perpendicular a la membrana (figura 11A). Este movimiento permitiría abrir el poro del canal al tirar hacia afuera de la región de enlace S4-S5. Sin embargo, aunque este modelo podría ser aplicable para el canal K_vAP , no parece que pueda aplicarse a todos los canales K_v (Tombola y cols, 2005).

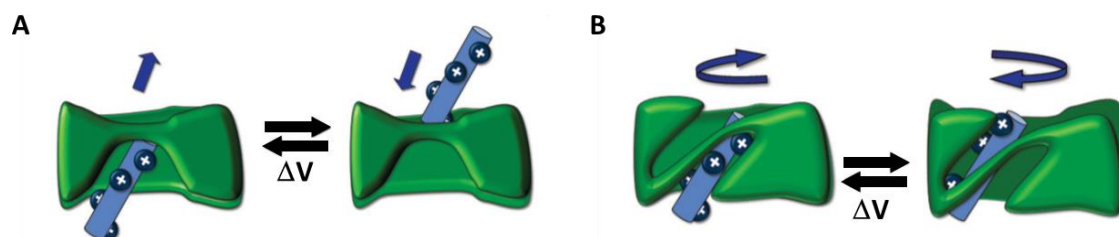


Figura 11. Movimiento del sensor de voltaje durante la activación de los canales K_v . (A) Modelo basado en la estructura cristalina del canal bacteriano K_vAP en el que se producen grandes movimientos del sensor de voltaje que conducen a la apertura del poro. (B) Modelo aceptado para los canales K_v en el que el segmento S4 sufre principalmente pequeños movimientos de rotación cuando se produce una despolarización de la membrana. Modificado de González y colaboradores (2012).

Posteriormente, los trabajos de Long y colaboradores supusieron un gran avance en la comprensión de la estructura de los canales K_v y la manera en la que los movimientos del sensor de voltaje se acoplan al poro del canal. Presentaron la estructura cristalina del canal $K_v1.2$ de

mamífero (Long y cols, 2005a; Long y cols, 2005b) y la quimera K_v1.2/2.1 (Long y cols, 2007), en su conformación abierta. El complejo que forman los segmentos S1-S4 interacciona con el dominio de poro (S5-P-S6) de la subunidad adyacente. Estos dos elementos estructurales interactúan mediante el conector S4-S5 que se coloca en la cara intracelular del canal. Las cargas de activación positivas en el S4 se estabilizan mediante interacciones por pares con cargas negativas en S1-S3 alineadas a lo largo de la interfaz con S4 (Papazian y cols, 1995; Yarov-Yarovoy y cols, 2006).

Según el consenso actual, los sensores de voltaje basados en el movimiento del segmento S4 tienen tres estados principales: reposo, activo y relajado. El S4 se mueve como una hélice 3_{10} entre los estados de reposo y activo, y adopta una estructura de hélice α más estable cuando evoluciona al estado relajado. De esta manera, el movimiento del sensor de voltaje durante la activación es una combinación de inclinación y rotación de la hélice S4 en la membrana, sin movimientos de traslación significativos (ver figura 11B). Este movimiento desplaza el conector S4-S5 y conduce a la apertura del poro (Blunck y Batulan, 2012; Long y cols, 2007; Villalba-Galea y cols, 2008).

Región de poro

La primera imagen atómica del canal KcsA de *Streptomyces lividans* (Doyle y cols, 1998) fue fundamental para determinar la estructura de la región de poro de los canales de potasio. El poro es una cavidad ocupada por moléculas de agua y está formado por la región P, que une los segmentos S5 y S6, los propios segmentos S5-S6, y la región peptídica que une S4 y S5. En la región P, que se localiza en la parte externa del canal, se encuentra la secuencia TVGYG, que está altamente conservada y funciona como un filtro de selectividad para conducir iones potasio. Los iones se hidratan en la cavidad central y se deshidratan en el filtro de especificidad. Los iones se mantienen estabilizados por ocho átomos de oxígeno que forman una estructura alrededor y así se encuentran como si estuvieran en solución. Los iones pasan por el filtro en fila, separados por una molécula de agua y, de los cuatro sitios de unión, sólo dos son ocupados al mismo tiempo. Cuando un ion sale del filtro entra otro por el lado opuesto. Finalmente, los iones se vuelven a hidratar en la salida extracelular (Kuang y cols, 2015).

La región del poro tiene especial importancia en la modulación farmacológica de estos canales, ya que es el sitio de unión de varios compuestos como el TEA (Choi y cols, 1991) y también, en el caso por ejemplo de los canales K_v7, de algunos moduladores específicos que se comentarán más adelante.

Dominio de tetramerización

Los canales de las familias K_v1-4 presentan un dominio de tetramerización o T1 en el extremo N-terminal que resulta fundamental para el reconocimiento entre subunidades α y, además, es responsable de la interacción con subunidades β y otras proteínas accesorias (Kreusch y cols, 1998; Xu y cols, 1995; Yellen, 2002). Por otro lado, los canales K_v7, K_v10 y K_v11 carecen de este dominio T1 y presentan un dominio en el extremo C-terminal implicado en el ensamblaje de las subunidades α (Yellen, 2002).

Mecanismos de inactivación

Los canales iónicos son capaces de adaptar varios estados conformacionales: un estado conductor o abierto, que permite el paso de iones, y dos estados no conductores (cerrado e inactivado). Después de una despolarización prolongada la mayoría de los canales K_v restringen el movimiento de iones a través del poro pasando a un estado inactivado desde el cual el canal no puede volver a activarse (Kuang y cols, 2015). Esta inactivación se produce por dos mecanismos diferentes. La inactivación rápida ($\approx 1-10$ ms) o **inactivación tipo N** también se conoce como modelo de la bola y la cadena. En este modelo la “bola”, una secuencia de 22 aminoácidos localizada en el extremo N-terminal, bloquea el paso de iones potasio uniéndose a la cara intracelular del poro en la conformación abierta (figura 12) (González y cols, 2012; Yellen, 2002). Los aminoácidos que unen esta bola al S1 forman la denominada “cadena”. Este mecanismo es característico de los canales $K_v1.4$, $K_v3.3$, $K_v3.4$ y los miembros de la familia K_v4 , que muestran una inactivación rápida.

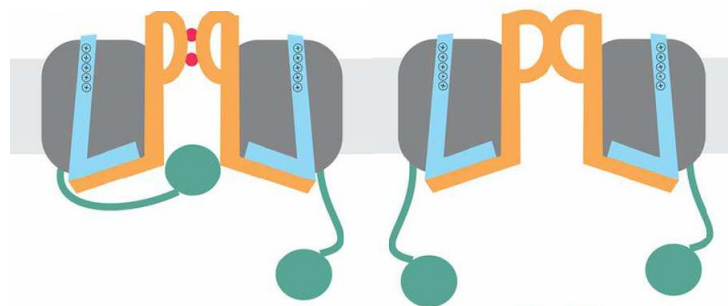


Figura 12. Mecanismos de inactivación de los canales K_v . A la izquierda está representada la inactivación tipo N, en la que la bola de inactivación bloquea la cara interna del poro del canal. A la derecha, la inactivación tipo C, que se produce por modificaciones conformacionales en la cara externa del poro que bloquean el paso de iones potasio. Modificado de Blunck y Batulan (2012).

Sin embargo, la mayoría de los canales de potasio, tanto procariotas como eucariotas, presentan otro tipo de inactivación más lenta (Kuang y cols, 2015). Este mecanismo fue descubierto cuando Hoshi y colaboradores (1990) eliminaron la inactivación tipo N. Se denomina **inactivación tipo C** porque en un principio se pensaba que dependía específicamente del extremo C-terminal. Posteriormente se demostró que en este mecanismo está implicado el filtro de selectividad y que depende de cambios conformacionales en cara externa del poro, impidiendo así la conducción de iones potasio (ver figura 12) (González y cols, 2012; Kuang y cols, 2015; López-Barneo y cols, 1993; Oliva y cols, 2005). Un incremento en la concentración extracelular de potasio disminuye este tipo de inactivación cuando se unen los iones en la cara externa del poro (López-Barneo y cols, 1993). Por otro lado, la inactivación tipo C se ve incrementada por la inactivación tipo N (Baukrowitz y Yellen, 1995). El bloqueo de la cara interna del poro disminuye la conductancia de potasio y, por tanto, la unión de iones en la cara externa del poro. En ambos casos el grado de inactivación es independiente del voltaje a potenciales en los que la activación es completa. Esto sugiere que tanto la inactivación tipo N como la inactivación tipo C son procesos acoplados a la activación de los canales.

3.1.2 Canales de potasio dependientes de voltaje y excitabilidad neuronal: implicación en la nocicepción

Hodgkin y Huxley (1952) definieron la excitabilidad como la propiedad funcional que tienen ciertas células para generar respuestas eléctricas ante los estímulos que reciben. La variabilidad de estas respuestas está dada por las propiedades de los diferentes tipos celulares y la distribución de los canales iónicos en la membrana celular.

Generalmente, la concentración de potasio es mayor en el citosol (130-160 mM) que en el medio extracelular (4-8 mM), por lo que la apertura de canales iónicos permeables al potasio va a generar una corriente de salida de estos iones hacia el exterior celular. Las corrientes de potasio activas en reposo contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana. En las células excitables, los canales de potasio también desempeñan un papel importante durante el potencial de acción, repolarizando la célula tras la despolarización y controlando la frecuencia de disparo. De esta manera, los canales de potasio son los principales reguladores de la excitabilidad neuronal. Varias canalopatías de canales iónicos de potasio, incluidos los canales K_v7 , están asociadas a enfermedades que cursan de hiperexcitabilidad del sistema nervioso como la epilepsia, resaltando la importancia que tienen estos canales en la regulación de la actividad neuronal (Blunck y Batulan, 2012; Jentsch, 2000).

En el sistema nervioso existen multitud de corrientes generadas por canales K_v que son fundamentales para el correcto funcionamiento neuronal. En base a su cinética de activación y desactivación y a la sensibilidad a determinados compuestos, los canales K_v neuronales se pueden clasificar en dos grupos principales: los canales de inactivación lenta o rectificadores tardíos, que son bloqueados por TEA y entre los que se incluyen los canales K_v7 neuronales ($K_v7.2-5$), y los canales de inactivación rápida, que son bloqueados preferentemente por 4-AP (González y cols, 2012). Los diferentes tipos de neuronas expresan sus propios conjuntos de canales K_v para regular su patrón de excitabilidad.

Canales rectificadores tardíos

La mayoría de los canales K_v del sistema nervioso son rectificadores tardíos que se activan lentamente para contrarrestar (rectificar) la despolarización. Los canales de la familia K_v1 también se conocen como canales activados por voltaje de bajo umbral. Estos canales regulan el umbral y la forma del potencial de acción, la conducción axónica y la transmisión sináptica. En el SNC y el SNP, los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$ se localizan preferentemente en el segmento inicial del axón y en el yuxtaparanodo de axones mielinizados, en el soma, así como en las terminales nerviosas, donde ejercen una regulación presináptica hiperpolarizando la terminal y reduciendo así la liberación de neurotransmisor (D'Adamo y cols, 2020; Dodson y cols, 2003; Wang y cols, 1994). Se ha demostrado la expresión de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$ en neuronas espinales (Rasband y Trimmer, 2001), incluidas motoneuronas, donde controlan el disparo repetido de potenciales de acción (Duflocq y cols, 2011). También se expresan en neuronas aferentes primarias. Aunque se han encontrado en neuronas de pequeño tamaño (presumiblemente nociceptores) (Ishikawa y cols, 1999), se localizan de forma predominante en neuronas de

tamaño medio y grande, a menudo formando heterotémeros (Fan y cols, 2014; Rasband y cols, 2001).

Varios trabajos han puesto de manifiesto la importancia de estos canales regulando la excitabilidad de las neuronas nociceptivas. En modelos de neuropatía se reduce la expresión del ARNm de los genes KCNA y de la proteína K_v1 en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Fan y cols, 2014; Kim y cols, 2002; Liang y cols, 2016; Rasband y cols, 2001; Zhang y cols, 2021) y en neuronas del asta dorsal (Miao y cols, 2017; Zhang y cols, 2021). La reducción en la expresión de estos canales genera un estado de hiperexcitabilidad neuronal que puede contribuir al desarrollo de dolor neuropático.

Algunos de estos trabajos, además, aportan información sobre los mecanismos que pueden estar implicados en los cambios de expresión de estos canales en situaciones patológicas. En un modelo de dolor por cáncer de hueso se produce un aumento de la enzima ADN metiltransferasa DNMT3a en neuronas del asta dorsal, que es responsable de la disminución en la expresión del mensajero del gen KCNA2 y la codificación de la proteína $K_v1.2$ (Miao y cols, 2017). Por otro lado, Liang y colaboradores (2016) demostraron que la metilación de histonas desencadenada por la histona metiltransferasa G9a también está involucrada en el silenciamiento del gen KCNA2 en neuronas de ganglio de la raíz dorsal axotomizadas. Además, Zhang y colaboradores (2021) observaron que la eliminación de los canales $K_v1.2$ mediante la administración intratecal de ARN pequeño de interferencia genera hipersensibilidad mecánica y térmica en ratas control. También demostraron que la función de los canales $K_v1.2$ está controlada por el micro ARN no codificante miR-137. La neuropatía por CCI reduce la expresión de $K_v1.2$ y al mismo tiempo incrementa la expresión de miR-137 en neuronas aferentes primarias y del asta dorsal de la médula espinal. La inhibición de miR-137 rescata la expresión de estos canales y atenúa la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica que genera este modelo. Estos resultados indican que diferentes mecanismos contribuyen al desarrollo de dolor mediante un silenciamiento epigenético de genes que codifican canales de potasio y abren una nueva línea de investigación para el desarrollo de tratamientos eficaces contra el dolor crónico.

Los canales K_v2 tienen una cinética de activación y desactivación mucho más lenta que los canales K_v1 . La activación de estos canales requiere una mayor despolarización, por eso también se los conoce como canales de alto umbral. Los K_v2 se activan en las últimas fases del potencial de acción y, por tanto, su apertura influye principalmente en la repolarización de la membrana y la hiperpolarización entre potenciales de acción sucesivos dentro de un tren de disparos (Busserolles y cols, 2016; Tsantoulas y McMahon, 2014). Los canales $K_v2.1$ y $K_v2.2$ son los principales responsables de la corriente I_K retardada en varios tipos de neuronas del SNC (González y cols, 2012; Tsantoulas y McMahon, 2014), y en concreto los $K_v2.2$ se expresan abundantemente en neuronas GABAérgicas en el prosencéfalo basal (Hermansteyne y cols, 2010). Los canales de la familia K_v2 , sobre todo la subunidad $K_v2.1$, también se expresan en neuronas de ganglio de la raíz dorsal de pequeño tamaño, pero se localizan en mayor medida en neuronas de tamaño grande (Bocksteins y cols, 2009; Ishikawa y cols, 1999; Tsantoulas y cols, 2014). Diferentes modelos de neuropatía producen una reducción en la expresión de estos canales en ambos tipos neuronales (Ishikawa y cols, 1999; Tsantoulas y cols, 2014) y un incremento en la excitabilidad de neuronas grandes (Tsantoulas y cols, 2014). También se ha observado que la neuropatía inducida por oxiplatino reduce la expresión de canales K_v2 en la

corteza somatosensorial primaria y secundaria, y puede contribuir a la hipersensibilidad mecánica y al frío (Thibault y cols, 2012). Los autores sugieren que, puesto que se produce una reducción parcial y no total en la expresión los canales K_v2 , el diseño de fármacos activadores específicos podría compensar la pérdida de función, reducir la excitabilidad y, por tanto, el dolor que generan estas lesiones nerviosas.

Canales de inactivación rápida

Los canales $K_v1.4$, $K_v3.3$, $K_v3.4$ y la familia K_v4 forman el grupo de canales de inactivación rápida y constituyen el sustrato molecular de la corriente I_A en el sistema nervioso. Estos canales también son importantes reguladores de la información nociceptiva. En neuronas de ganglio de la raíz dorsal, los canales $K_v3.4$ se expresan principalmente en nociceptores de fibra C y están localizados en el soma, a lo largo del axón y en las terminales centrales que alcanzan el asta dorsal (Chien y cols, 2007; Muqeem y cols, 2018). Mientras que los canales $K_v4.3$ se expresan selectivamente en los somas de nociceptores de fibra C no peptidérgicos (Chien y cols, 2007).

En varios modelos de dolor, incluida neuropatía o dolor por cáncer de hueso, se reduce la expresión de canales de inactivación rápida y la corriente I_A en neuronas aferentes primarias (Cao y cols, 2010; Chien y cols, 2007; Duan y cols, 2012; Kim y cols, 2002; Rasband y cols, 2001). En concreto, en el modelo de neuropatía diabética, se reduce la corriente I_A en neuronas de ganglio de la raíz dorsal de tamaño medio y grande (Cao y cols, 2010) y parece que el BDNF tiene un papel importante en la reducción de la actividad de estos canales. La ligadura del nervio ciático reduce en gran medida los niveles de expresión de los canales $K_v3.4$ y $K_v4.3$, y genera una hipersensibilidad tanto mecánica como térmica. Además, la supresión de estos canales tras la administración intratecal de oligodesoxinucleótidos antisentido en ratones naïve produce también una hipersensibilidad mecánica (Chien y cols, 2007).

Por otra parte, Muqeem y colaboradores (2018) demostraron que el bloqueo farmacológico de los canales $K_v3.4$ aumenta las corrientes postsinápticas excitadoras en neuronas de lámina I y lámina II del asta dorsal a través de un mecanismo presináptico. Por lo tanto, la atenuación de conductancias de potasio en las terminales de las aferentes primarias puede conducir a una mayor liberación de glutamato en el asta dorsal de la médula espinal y como consecuencia un incremento de la excitabilidad de las neuronas espinales (Muqeem y cols, 2018). Por su parte, la subunidad $K_v4.2$ es la principal responsable de la corriente I_A en neuronas espinales del asta dorsal. Mutaciones en estos canales generan un estado de hiperexcitabilidad en estas neuronas, acompañado de un aumento de la sensibilidad mecánica y térmica (Hu y cols, 2006). Además, los ratones mutantes no muestran hiperalgesia en modelos de dolor inflamatorio como si lo hacen los ratones control. Estos resultados sugieren que la inflamación periférica produce cambios en la expresión y/o función de los canales $K_v4.2$ en las neuronas del asta dorsal y la modulación farmacológica de estos canales podría ser útil en el tratamiento del dolor inflamatorio. En su conjunto, estos resultados subrayan la importancia de los canales de potasio de inactivación rápida en las aferentes primarias y las neuronas espinales en situaciones de sensibilización central y dolor.

3.2 Canales de potasio K_v7

La familia de genes **KCNQ** comprende cinco miembros (KCNQ1-5) ubicados en los loci cromosómicos 11p15, 20q13, 8q24, 1p34 y 6q13, respectivamente. Cada gen KCNQ expresa una proteína **K_v7** ($K_v7.1$ - $K_v7.5$) de 650 a 940 aminoácidos. Estas subunidades se ensamblan en un canal de potasio tetramérico (Barrese y cols, 2018). La subunidad $K_v7.1$ forma homotetrámeros, mientras que el resto de las subunidades se pueden ensamblar formando heterotetrámeros. La subunidad $K_v7.3$ puede ensamblar con la $K_v7.2$ o la $K_v7.5$, lo que incrementa la expresión de proteínas en la membrana plasmática. $K_v7.4$ es menos capaz de heteromerizar con $K_v7.3$ o $K_v7.2$ pero se ensambla fácilmente con $K_v7.5$ (Bal y cols, 2008), especialmente en el músculo liso vascular (Brueggemann y cols, 2014).

En el sistema nervioso, estos canales son responsables de la corriente M de potasio, descrita por primera vez por Brown y Adams (1980) en neuronas de ganglio simpático de rana. Al año siguiente fue descrita en neuronas simpáticas de rata (Constanti y Brown, 1981) y se denominó **corriente M** porque la activación de receptores muscarínicos inhibe esta corriente (Adams y cols, 1982). Sin embargo, no fue hasta 1998 cuando se determinó que los canales K_v7 constituyen el sustrato molecular de la corriente M (Wang y cols, 1998).

La investigación de la estructura y función de los canales K_v7 reviste una especial importancia dado que mutaciones en cuatro de los cinco genes KCNQ (KCNQ1-4) generan trastornos neurológicos o cardíacos en humanos (Jentsch, 2000).

3.2.1 Estructura y modulación de los canales K_v7

La estructura de las subunidades α de los canales K_v7 es la misma que en el resto de los canales K_v , estando formadas por seis segmentos transmembrana (S1-S6). El sensor de voltaje se encuentra en el dominio formado por los segmentos S1-S4, mientras que los segmentos S5-S6 y la región P que los une, constituyen el dominio de formación del poro. Los extremos N y C-terminales se localizan hacia el citoplasma. Una característica particular de la estructura de estos canales es que el extremo C-terminal es considerablemente más largo que el de otros canales K_v . Está organizado en cuatro hélices (A-D) que contienen regiones que determinan el ensamblaje de subunidades específicas (Schwake y cols, 2003) y sitios de unión para diferentes moduladores como PIP_2 o calmodulina (Choveau y cols, 2018; Hernandez y cols, 2008; Yus-Najera y cols, 2002).

Los canales K_v7 están regulados directamente por voltaje, pero también por la acción de varios receptores de membrana y ligandos intracelulares. Esta regulación tan compleja da idea de la importancia de estos canales dentro del sistema nervioso. El **PIP_2** es un componente clave para el correcto funcionamiento de todos los canales K_v7 , aumentando la probabilidad de apertura y estabilizando la configuración de canal abierto (Li y cols, 2005; Zhang y cols, 2003). La reducción de PIP_2 por fosfolipasa C (PLC- β) es el mecanismo principal de regulación de estos canales (Hernandez y cols, 2009). La activación de los **receptores muscarínicos M1** de acetilcolina, acoplados a proteínas G (G_{q11}), estimula la activación de la PLC- β (figura 13). Esta activación

provoca la hidrólisis de PIP_2 , generando IP_3 , que difunde al citosol, y diacilglicerol unido a la membrana. Es la propia hidrólisis del PIP_2 la que inhibe los canales K_v7 (Delmas y Brown, 2005). Las distintas subunidades presentan afinidades diferentes por PIP_2 (Brueggemann y cols, 2020; Choveau y cols, 2018; Li y cols, 2005). Los canales homoméricos $\text{K}_v7.3$ muestran una afinidad más elevada por PIP_2 que las subunidades $\text{K}_v7.2$, $\text{K}_v7.4$ y $\text{K}_v7.5$, mientras que los canales heteroméricos $\text{K}_v7.2/3$ tienen una afinidad intermedia. Por tanto, aunque es un mecanismo común en todos los canales K_v7 , unas subunidades son más sensibles que otras a la inactivación por PLC- β .

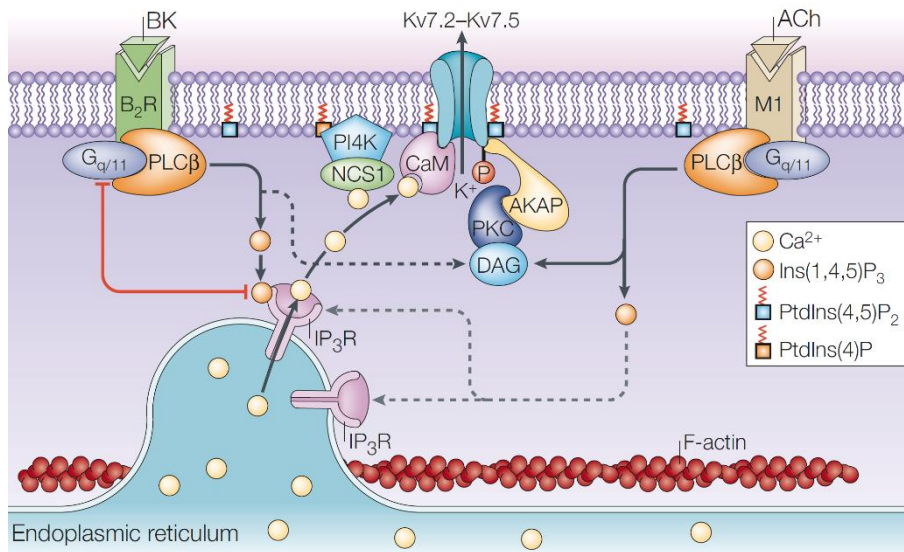


Figura 13. Regulación intracelular de los canales K_v7 . Los receptores muscarínicos M1 de acetilcolina (ACh) y los receptores B2 de bradicinina (BK) están implicados en la modulación de los canales K_v7 . La estimulación de estos receptores, que están acoplados a proteínas G ($\text{G}_{\alpha/11}$), produce la hidrólisis del PIP_2 de la membrana plasmática vía fosfolipasa C (PLC- β). La activación de los receptores B2, a su vez, activa los receptores IP_3 del retículo endoplasmático, permitiendo la difusión de Ca^{2+} al citosol. El Ca^{2+} interactúa con los canales K_v7 a través de calmodulina (CaM). La reducción de los niveles de PIP_2 y el aumento del Ca^{2+} intracelular son los principales responsables del cierre de los canales K_v7 por la activación de estos receptores. Tomado de Delmas y Brown (2005).

La corriente M neuronal también es inhibida por el **calcio intracelular** y dicha inhibición está mediada por **calmodulina** (Gamper y Shapiro, 2003). Sin embargo, la sensibilidad a Ca^{2+} difiere entre las diferentes subunidades y viene determinada por la región C-terminal. De esta manera la unión de Ca^{2+} a calmodulina inhibe los canales $\text{K}_v7.2$, $\text{K}_v7.4$ y $\text{K}_v7.5$, y no parece tener efecto sobre los $\text{K}_v7.3$. Por otro lado, estimula la actividad de los canales $\text{K}_v7.1$ y el complejo $\text{K}_v7.1$ -KCNE1 (Gamper y cols, 2005; Shamgar y cols, 2006). Los canales K_v7 presentan sitios de unión a calmodulina en el extremo C-terminal, uno en la hélice A y otro en la hélice B (Yus-Najera y cols, 2002). Un trabajo reciente demostró el mecanismo por el cual el Ca^{2+} intracelular produce el cierre de los canales K_v7 . La interacción de Ca^{2+} y calmodulina genera un cambio conformacional de la propia calmodulina, que se traduce en una reorientación de las hélices A y B del extremo C-terminal del canal $\text{K}_v7.2$ y en último término provoca el cierre del poro del canal (Bernardo-Seisdedos y cols, 2018). En los canales $\text{K}_v7.4$, la región de enlace entre S2 y S3 también parece esencial en la regulación por calmodulina (Zhuang y Yan, 2021). Además, la unión a calmodulina

es necesaria para el correcto plegado del extremo C-terminal de los canales $K_v7.1$ y para el tráfico de estos canales a la membrana plasmática (Shamgar y cols, 2006).

Algunos de los efectos de calmodulina parece que se deben a la modulación de la afinidad de PIP_2 sobre los canales K_v7 puesto que, en el extremo C-terminal, los sitios de unión para PIP_2 y calmodulina se superponen parcialmente. Aunque los estudios iniciales identificaron un residuo de histidina en la región proximal del extremo C-terminal como el sitio de interacción de PIP_2 sobre los canales $K_v7.2$ (Zhang y cols, 2003), posteriormente se identificó que una región localizada entre la hélice A y la hélice B del dominio C-terminal también constituye un sitio de unión de PIP_2 (Hernandez y cols, 2008). Más recientemente, se ha demostrado que PIP_2 y calmodulina compiten por el sitio de unión en el extremo C-terminal de los canales $K_v7.1$ y desempeñan la misma función, estabilizando el estado abierto de estos canales (Tobelaim y cols, 2017). También se han identificado otros sitios de interacción de PIP_2 en las regiones que unen los segmentos transmembrana S2-S3 y S4-5 (Choveau y cols, 2018).

Los receptores muscarínicos no son los únicos que participan en la regulación de los canales K_v7 . En neuronas simpáticas y aferentes primarias, la activación de los **receptores B2 de bradicinina** también inhibe los canales K_v7 (Cruzblanca y cols, 1998; Linley y cols, 2012; Liu y cols, 2010). La estimulación con bradicinina produce la hidrólisis de PIP_2 vía PLC- β y un aumento del Ca^{2+} intracelular (ver figura 13). Los receptores B2 están estrechamente acoplados con los receptores IP3 del retículo endoplasmático, al contrario que los receptores M1 (Delmas y cols, 2002). La activación de los receptores IP3 libera las reservas endoplasmáticas de Ca^{2+} , que difunde al citosol. En este caso, parece que la propia hidrólisis de PIP_2 no es suficiente para el cierre de los canales. Esto se debe a que la liberación de Ca^{2+} parece estimular la síntesis de PIP_2 , posiblemente a través de la proteína NCS1, previniendo así su agotamiento. Por lo que el Ca^{2+} es el principal responsable del cierre de los canales K_v7 cuando se activan los receptores B2 de bradicinina (Delmas y Brown, 2005). De manera similar, la activación de los receptores MrgprD y los receptores de proteasas PAR-2, inhibe la corriente M en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Crozier y cols, 2007; Linley y cols, 2008).

3.2.2 Expresión de los canales K_v7

Los canales $K_v7.1$ tienen funciones diferentes dependiendo del tejido en el que se expresan. En el corazón se asocian con la proteína accesoria minK y generan la corriente de potasio rectificadora retardada de activación lenta (I_{Ks}), fundamental para la repolarización adecuada de los potenciales de acción cardíacos (Barhanin y cols, 1996). Diferentes mutaciones en los genes que codifican las proteínas $K_v7.1$ y minK se han relacionado con el síndrome de QT largo y se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales resultantes, que tiene como consecuencia una repolarización más lenta de las células del músculo cardíaco (Jentsch, 2000). La combinación de $K_v7.1$ y minK también está presente en la cóclea, donde contribuyen a mantener una concentración alta de potasio en la endolinfa. Mutaciones con una pérdida de función más severa en cualquiera de las dos subunidades pueden generar el síndrome de Jervell y Lange-Nielsen, en el que la arritmia cardíaca se asocia con sordera congénita (Neyroud y cols, 1997). Además, los canales $K_v7.1$ junto con la subunidad reguladora KCNE3, reciclan el potasio

en la membrana basolateral de las criptas intestinales, lo que proporciona la fuerza impulsora necesaria para la secreción del cloruro (Jentsch, 2000).

El resto de las subunidades de los canales K_v7 están presentes en el sistema nervioso, aunque también se expresan en otros tejidos como el músculo liso (ver Soldovieri y cols, 2011). Las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso y su perfil de expresión solapa extensamente. En diferentes zonas del cerebro humano estas dos subunidades colocalizan y se ensamblan entre sí (Cooper y cols, 2000). También se expresan en neuronas de los ganglios simpáticos (Wang y cols, 1998) y ganglios de la raíz dorsal (Passmore y cols, 2003). A nivel subcelular estas subunidades se localizan predominantemente en el segmento inicial del axón y en los nodos de Ranvier, tanto en el SNC como en el SNP (Devaux y cols, 2004; Pan y cols, 2006; Roza y cols, 2011; Schwarz y cols, 2006). Las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ comparten un sitio de unión a anquirina G en el extremo C-terminal que facilita el anclaje de estos canales en el segmento inicial del axón y los nodos de Ranvier junto con los canales de sodio dependientes de voltaje. Sin embargo, la mutación del sitio de unión a anquirina G reduce, pero no suprime por completo, la orientación de los canales K_v7 al segmento inicial del axón, sugiriendo que existen señales adicionales para la expresión preferente en los axones (Chung y cols, 2006). En los nodos de Ranvier del SNP, los canales $K_v7.2$ y $K_v7.3$ parecen ser responsables de la corriente nodal I_{K_S} , con características similares a la corriente M (Schwarz y cols, 2006). Además, se han observado subunidades de canales K_v7 en terminales presinápticas, donde actúan regulando la liberación de neurotransmisores (Martire y cols, 2004), y un estudio reciente de microscopía electrónica muestra que $K_v7.2$, $K_v7.3$, y también $K_v7.5$, colocalizan con receptores muscarínicos de acetilcolina en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de capa III de la corteza prefrontal de primates (Galvin y cols, 2020).

Mutaciones en las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ producen varios tipos de epilepsias y encefalopatías. La patología más común se conoce como convulsiones neonatales familiares benignas (BFNS de sus siglas en inglés). Se trata de un síndrome epiléptico idiopático autosómico dominante, caracterizado por la aparición de convulsiones tónico-clónicas focales, multifocales o generalizadas que comienzan alrededor del día tres de nacimiento y tienen una probabilidad bastante alta de remitir espontáneamente dentro de los primeros dos meses de vida (Biervert y cols, 1998; Castaldo y cols, 2002; Jentsch, 2000). Dedek y colaboradores (2001) describieron una mutación que afecta al sensor de voltaje S4 del canal $K_v7.2$ y produce una epilepsia neonatal y mioquimia (contracciones musculares involuntarias) durante el desarrollo. Las mutaciones del gen *KCNQ2* que conducen a la actividad epiléptica son generalmente autosómicas dominantes y son responsables de un amplio espectro de fenotipos caracterizados por hiperexcitabilidad, que van desde una epilepsia leve como la BFNS, hasta encefalopatías epilépticas graves con deterioro cognitivo y convulsiones resistentes a fármacos como la encefalopatía epiléptica neonatal. De manera general, las mutaciones que afectan a la dependencia del voltaje, la interacción con PIP_2 o la localización subcelular en regiones neuronales clave se asocian con fenotipos más graves (para una revisión ver Nappi y cols, 2020).

La subunidad $K_v7.4$ se expresa predominantemente en los sistemas auditivo y vestibular, y juega un papel importante en la audición. Estos canales están localizados en las células sensoriales ciliadas externas de la cóclea, contribuyendo a mantener el potencial de reposo (Kharkovets y cols, 2006; Kubisch y cols, 1999). La mutación del gen *KCNQ4* en humanos genera una forma

autosómica dominante de pérdida auditiva de progresión lenta. La pérdida de función de los canales $K_v7.4$ afecta a la audición porque se ve alterada la electromotilidad de las células ciliadas externas y causa su degeneración progresiva (Kharkovets y cols, 2006). Un estudio más reciente ha revelado que los canales $K_v7.4$ se expresan en aproximadamente un 10% de las neuronas de ganglio de la raíz dorsal de ratón y en mecanorreceptores periféricos de bajo umbral de adaptación rápida, donde participan en la modulación de la sensibilidad táctil (Heidenreich y cols, 2011). Algunas personas con pérdida de audición por mutaciones del gen *KCNQ4* también presentan un aumento de sensibilidad a las vibraciones de baja frecuencia.

La subunidad $K_v7.5$ fue el último miembro de la familia en ser identificado y está ampliamente distribuido en diferentes zonas del encéfalo, que incluye el tronco del encéfalo, la corteza y el hipocampo, y muestra una distribución que se superpone en gran medida a las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ (Fidzinski y cols, 2015; Lerche y cols, 2000; Schroeder y cols, 2000; Shah y cols, 2002; Yus-Nájera y cols, 2003). También se ha descrito en ganglios simpáticos (Schroeder y cols, 2000), ganglios de la raíz dorsal (Passmore y cols, 2003) y fibras aferentes C (King y Scherer, 2012). Además, las subunidades $K_v7.4$ y $K_v7.5$ también se expresan en células del músculo liso vascular, donde pueden formar heterotetrámeros (Brueggemann y cols, 2014).

3.2.3 Fisiología de los canales K_v7

Las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ expresadas en ovocitos producen una corriente de potasio con las mismas características biofísicas y sensibilidad farmacológica que la corriente M nativa de neuronas simpáticas de ganglio cervical superior (Wang y cols, 1998). Estas subunidades pueden formar canales homoméricos, pero los niveles de corriente M son menores, sobre todo en el caso de los canales $K_v7.3$. Sin embargo, cuando las dos subunidades se asocian formando canales heteroméricos la corriente aumenta hasta diez veces (Wang y cols, 1998). Teniendo en cuenta estos resultados y sumado al solapamiento en la expresión de ambas subunidades en el sistema nervioso, se considera que los canales heteroméricos $K_v7.2/3$ son los principales responsables de la corriente M neuronal. Más recientemente, Soh y colaboradores (2014) utilizaron ratones knockout condicionales de *KCNQ2* y *KCNQ3* y demostraron una clara reducción de la corriente M en neuronas deficientes en $K_v7.2$. Estas neuronas presentan una hiperpolarización después del potencial de acción reducida y una prolongada despolarización después del potencial de acción. Sin embargo, las neuronas deficientes en $K_v7.3$ tienen unas propiedades de disparo casi normales. Estos resultados sugieren que los canales homoméricos $K_v7.2$ pueden contribuir de manera importante a la corriente M neuronal, al menos en las neuronas piramidales de la corteza estudiadas en este trabajo.

Por otro lado, los canales homoméricos $K_v7.5$ expresados en ovocitos también producen una corriente con una cinética de activación muy lenta, similar a la corriente M. Además, pueden formar canales heteroméricos funcionales con la subunidad $K_v7.3$, cuyo ensamblaje produce un aumento de la corriente (Lerche y cols, 2000). Curiosamente, la expresión de $K_v7.5$ junto con $K_v7.2$ y $K_v7.3$ en la misma célula reduce la corriente total porque la cantidad de $K_v7.3$ disponible para formar los heterómeros $K_v7.2/3$, que son más “eficientes”, se reduce al unirse $K_v7.3$ junto con $K_v7.5$ (Schroeder y cols, 2000). Dado que las tres subunidades de K_v7 se expresan

ampliamente en el cerebro y muestran un patrón de expresión celular superpuesto (Shah y cols, 2002), se considera que la subunidad $K_v7.5$ contribuye a la variedad funcional de la corriente M en distintas poblaciones neuronales.

La corriente M se encuentra parcialmente activa al potencial de reposo, por lo que participa en el mantenimiento del potencial de membrana. Dado que su activación es relativamente lenta, no contribuye demasiado a la repolarización de los potenciales de acción individuales. Sin embargo, debido a que la corriente no se inactiva, sino que permanece activa durante un tiempo prolongado durante la despolarización, ejerce un efecto regulador importante sobre el disparo repetido de potenciales de acción. El bloqueo de esta corriente despolariza y aumenta la resistencia de la membrana de las neuronas, lo que se traduce en un aumento de la excitabilidad. Por otro lado, la facilitación de la apertura de los canales K_v7 tiene los efectos opuesto. Por lo que la corriente M desempeña un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad de un gran número de neuronas (Brown y Passmore, 2009).

3.2.4 Farmacología de los canales K_v7

Hasta el momento se han diseñado diferentes compuestos exógenos, que son capaces de modular de manera efectiva los canales K_v7 , actuando como facilitadores o como bloqueantes, y que han permitido avanzar en el conocimiento de los procesos fisiológicos en los que se encuentran implicados estos canales.

Linopirdina y su análogo más potente **XE-991** son los bloqueantes de canales K_v7 más utilizados (Lamas y cols, 1997; Zaczek y cols, 1998). Estos compuestos actúan sobre todas las subunidades de canales K_v7 , incluida la $K_v7.1$. Sin embargo, en las corrientes cardiacas nativas los canales $K_v7.1$ se asocian con la subunidad auxiliar minK, reduciendo la sensibilidad de XE-991 por estos canales (Wang y cols, 2000). Los bloqueantes linopirdina ($EC_{50} = 2,1 \mu M$) y XE-991 ($EC_{50} = 0,26 \mu M$) inhiben la corriente M nativa de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Passmore y cols, 2003) y han permitido identificar corriente M en varios tipos de neuronas, incluidas neuronas de la médula espinal (Alaburda y cols, 2002; Lombardo y Harrington, 2016; Rivera-Arconada y Lopez-Garcia, 2005). Existen algunos bloqueantes más selectivos sobre subunidades concretas de canales K_v7 . El mejor caracterizado es UCL2077, que muestra efectos más potentes sobre los canales $K_v7.2$ (Soh y Tzingounis, 2010). El bloqueo de los canales K_v7 neuronales produce una despolarización de la membrana e incrementa la frecuencia de disparo de potenciales de acción (Alaburda y cols, 2002; Lombardo y Harrington, 2016; Otto y cols, 2002; Rivera-Arconada y Lopez-Garcia, 2005). En esta Tesis se ha utilizado fundamentalmente XE-991 porque es más potente que linopirdina.

Retigabina es el compuesto facilitador de los canales K_v7 más estudiado. Rundfeldt (1997) fue el primero en identificar que retigabina era capaz de aumentar una conductancia de potasio en varias líneas celulares y en neuronas corticales de ratón. Años más tarde varios trabajos demostraron que retigabina es capaz de activar los canales homoméricos $K_v7.2$, $K_v7.3$ y $K_v7.4$ y los heteroméricos $K_v7.2/3$ (Tatulian y cols, 2001) y $K_v7.3/5$ (Wickenden y cols, 2001) con una potencia variable entre las distintas configuraciones. La subunidad $K_v7.3$ es la más sensible mientras que no tiene efecto sobre los canales $K_v7.1$ (Tatulian y cols, 2001). Retigabina modifica

la cinética de la corriente M, acelerando su activación y ralentizando su desactivación, lo que se traduce en una hiperpolarización de las células. Un residuo de triptófano localizado en la región citosólica del segmento transmembrana S5 constituye el sitio de unión de retigabina (Schenzer y cols, 2005; Wuttke y cols, 2005). Este residuo está ausente en los canales $K_v7.1$, razón por la que esta subunidad es insensible a retigabina. Sin embargo, retigabina no es un compuesto completamente específico sobre los canales K_v7 . A partir de una concentración de $10 \mu\text{M}$ también es capaz de potenciar la transmisión GABAérgica en el SNC, favoreciendo la unión de GABA a los receptores GABA-A (Rundfeldt y Netzer, 2000; van Rijn y Willems-van Bree, 2003).

La modulación de los canales de K_v7 con retigabina tiene un impacto importante en la excitabilidad de diferentes tipos de neuronas (Lombardo y Harrington, 2016; Otto y cols, 2002; Passmore y cols, 2003; Rivera-Arconada y Lopez-Garcia, 2005), hiperpolarizando la membrana y reduciendo el disparo repetido de potenciales de acción (figura 14).

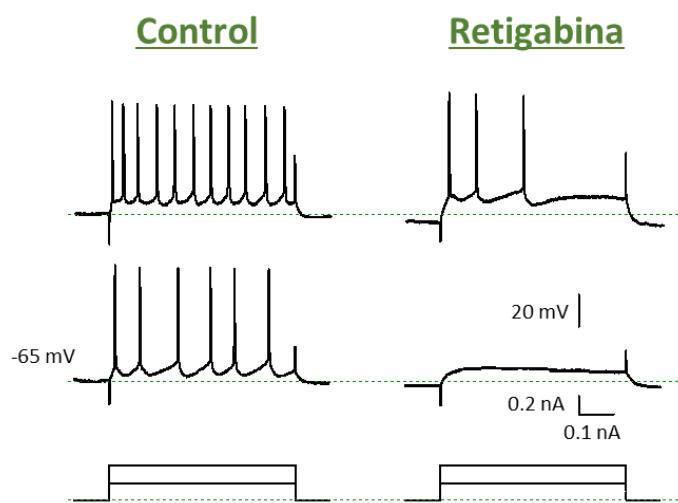


Figura 14. Efecto de retigabina en la excitabilidad neuronal. Registro intracelular de las respuestas a pulsos de corriente despolarizante de una neurona del asta dorsal de la médula espinal. A la izquierda se muestran las respuestas en condiciones control a dos pulsos de corriente, y a la derecha las respuesta a los mismos pulsos tras la aplicación de retigabina $10 \mu\text{M}$. Se puede observar como retigabina produce una hiperpolarización y reduce el disparo de potenciales de acción. Modificado de Rivera-Arconada y Lopez-Garcia (2005).

Tras los resultados del estudio de French y colaboradores (2011), el uso clínico de retigabina fue aprobado para el tratamiento complementario de las crisis parciales fármaco-resistentes en adultos con epilepsia, con o sin generalización secundaria, y cuando otras combinaciones apropiadas con otros medicamentos hayan resultado inadecuadas o no hayan sido toleradas por el paciente. A partir de 2011 retigabina fue comercializada por la farmacéutica GSK como Trobalt® en Europa y Potiga® en Estados Unidos. Sin embargo, ensayos de farmacovigilancia con retigabina identificaron reacciones adversas, tales como mareos, somnolencia y dolor de cabeza, además de efectos adversos adicionales después de un uso prolongado, que incluyen retención urinaria, decoloración de la piel y pigmentación retiniana (Daniluk y cols, 2016; Splinter, 2013). Por lo tanto, en 2016 la Agencia Europea del Medicamento decidió la suspensión de la comercialización de retigabina, que finalmente se produjo en junio de 2017. Aun así,

retigabina sigue siendo una herramienta de investigación útil y un fármaco de referencia en los modelos de dolor en animales.

Otro fármaco con actividad facilitadora sobre los canales K_v7 es **flupirtina**. Aunque se consideró inicialmente que era un inhibidor de receptores NMDA, no se ha encontrado una interacción directa sobre estos receptores. La activación de los canales K_v7 conduce a una estabilización del potencial de membrana en reposo en las neuronas y, por lo tanto, provoca una inhibición indirecta de los receptores de NMDA. Se ha demostrado que flupirtina activa los canales $K_v7.2$ y los $K_v7.2/3$ en varias líneas celulares (Klinger y cols, 2012; Martire y cols, 2004), así como canales K_v7 nativos en varios tipos neuronales, incluidas neuronas de ganglio de la raíz dorsal y neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Klinger y cols, 2012; Wladyka y Kunze, 2006). Flupirtina modula positivamente los canales K_v7 con un mecanismo de acción similar a retigabina, aumentando la corriente y desplazando el voltaje de activación hacia potenciales más hiperpolarizados. La activación de los canales K_v7 *in vitro* por parte de flupirtina se produce a concentraciones cercanas al rango terapéutico (2-6 μM) (Devulder, 2010), lo que sugiere que la activación de los canales de K_v7 podría estar implicada en la actividad analgésica de flupirtina. Sin embargo, al igual que retigabina, flupirtina produce una potenciación de las corrientes mediadas por receptores de GABA-A (Klinger y cols, 2012). Estos resultados sugieren que la acción analgésica de flupirtina podría deberse a una acción conjunta sobre los canales K_v7 y los receptores de GABA.

Flupirtina (Katadolon®) se ha utilizado clínicamente en Alemania y otros países de Europa desde 1984 como analgésico no opioide de acción central para el tratamiento de dolor postoperatorio, traumático y por cáncer (Devulder, 2010). Sin embargo, el tratamiento con flupirtina también produce efectos adversos, en concreto lesiones hepáticas graves que en algunos casos implicaron trasplante de hígado e incluso la muerte (Douros y cols, 2014; Perdigoto y cols, 2018). Por esta razón, la Agencia Europea del Medicamento retiró la comercialización de flupirtina en el año 2018.

Los facilitadores retigabina y flupirtina son compuestos potentes, pero con efectos sobre otras dianas y poco selectivos sobre subunidades concretas de los canales K_v7 . Con el fin de desarrollar herramientas más potentes y selectivas, el diseño farmacológico ha seguido diferentes estrategias que incluyen la modificación estructural de compuestos previamente caracterizados y el desarrollo de estructuras novedosas identificadas mediante cribado de alto rendimiento (ver (Wickenden y McNaughton-Smith, 2009).

En esta Tesis se han utilizado dos nuevos moduladores de los canales K_v7 como son **ICA-069673** y **ML213**. ICA-069673 es un facilitador de los canales $K_v7.2$, con un efecto mucho menor sobre los canales $K_v7.3$ (Wang y cols, 2017). Por lo que ICA-069673 muestra un perfil farmacológico diferente a los facilitadores clásicos que no discriminan entre las distintas subunidades de canales K_v7 neuronales. Sin embargo, a concentraciones más elevadas, parece que ICA-069673 bloquea las corrientes generadas por los canales $K_v7.5$ (Brueggemann y cols, 2014). Por su parte, ML213 es un potente activador de canales $K_v7.2$ ($EC_{50} = 0,23 \mu\text{M}$) y $K_v7.4$ ($EC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$), aunque también es capaz de activar los canales $K_v7.2/3$, $K_v7.5$ y $K_v7.4/5$ con una potencia similar (Brueggemann y cols, 2014; Kanyo y cols, 2020; Yu y cols, 2011).

Además de ICA-069673 y ML213, en los últimos años se han diseñado numerosos moduladores de los canales K_v7 . ICA-27243, de estructura similar a ICA-069673, también es un activador de canales homoméricos $K_v7.2$ y heteroméricos $K_v7.2/3$ ($EC_{50} = 0,38 \mu M$), y tiene muy poco efecto sobre los canales $K_v7.4$ ($EC_{50} = 9,7 \mu M$) y $K_v7.3/5$ (a partir de $30 \mu M$) (Blom y cols, 2010; Wickenden y cols, 2008). Además, a diferencia de retigabina y flupirtina, no afecta a los receptores GABA-A (Roeloffs y cols, 2008; Wickenden y cols, 2008). Por otro lado, QO-58 aumenta significativamente la corriente de los canales $K_v7.1$, $K_v7.2$, $K_v7.4$ y $K_v7.3/K_v7.5$, pero no de los canales $K_v7.3$, mostrando una potencia mayor sobre las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.4$ (Zhang y cols, 2013). QO-58 ($10 \mu M$) aumenta la corriente M nativa en neuronas de ganglio de la raíz dorsal, de manera similar a retigabina, hiperpolarizando el potencial de membrana en reposo. Además, la aplicación de XE-991 abole la hiperpolarización generada por QO-58, indicando una especificidad por los canales K_v7 (Zhang y cols, 2013). En esta misma línea, SCR2682 activa los canales $K_v7.2-5$, con un efecto dependiente de concentración y muestra una EC_{50} de alrededor de $10 nM$ en canales heteroméricos $K_v7.2/3$ (Zhang y cols, 2019). Este compuesto es 100 veces más potente que retigabina activando los canales $K_v7.2/3$.

Por otro lado, algunos fármacos de uso común como son los antiinflamatorios **diclofenaco** y **celecoxib**, que también se han utilizado en esta Tesis, son capaces de modular los canales K_v7 . Diclofenaco aumenta la corriente de potasio producida por canales heteroméricos $K_v7.2/3$ con una EC_{50} de $2,6 \mu M$ (Peretz y cols, 2005). También inhibe los canales $K_v7.5$ ($IC_{50} = 20 \mu M$) y aumenta las corrientes producidas por canales $K_v7.4$ a partir de una concentración de $30 \mu M$ (Brueggemann y cols, 2011). Por su parte, celecoxib activa los canales $K_v7.5$ en células de músculo de rata con un aumento de la corriente dependiente de concentración (Brueggemann y cols, 2009). Trabajos posteriores estudiaron los efectos de celecoxib en diferentes configuraciones homoméricas y heteroméricas de canales K_v7 . Celecoxib inhibe los canales $K_v7.1$ (Du y cols, 2011; Frolov y cols, 2011) y activa los canales $K_v7.2-4$, $K_v7.2/3$ y $K_v7.3/5$ (Du y cols, 2011; Mi y cols, 2013). Los autores sugieren que estas acciones pueden contribuir a su acción analgésica. En esta misma línea, el metabolito del paracetamol, NAPQI, aumenta la corriente mediada por canales K_v7 en neuronas de ganglio de la raíz dorsal y neuronas del asta dorsal de la médula espinal de rata, y la corriente producida por canales $K_v7.2$ y $K_v7.3$ humanos expresados en células tsA201 (Ray y cols, 2019). El diseño de nuevos derivados de antiinflamatorios no esteroideos que mantengan la capacidad de modular los canales K_v7 , pero sin actividad sobre las ciclooxigenasas (COXs), podría permitir la obtención de facilitadores de canales K_v7 potentes y específicos por determinadas subunidades que podrían ser aplicables al tratamiento de diversas patologías en humanos (Mi y cols, 2013; Peretz y cols, 2007).

3.2.5 Canales K_v7 y nocicepción

Los canales K_v7 están presentes en zonas clave de las vías nociceptivas y su activación por compuestos selectivos ejerce acciones antihiperalgésicas en varios modelos de dolor, por lo que el interés en la modulación de estos canales con fines analgésicos ha aumentado desde hace años (Rivera-Arconada y cols, 2009).

Expresión de los canales K_v7 en aferentes primarias y neuronas espinales

Passmore y colaboradores (2003) describieron por primera vez la expresión de las subunidades $K_v7.2$, $K_v7.3$ y $K_v7.5$ en neuronas de **ganglio de la raíz dorsal** nociceptivas y no nociceptivas, con una expresión predominante de las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ (ver figura 15). Un trabajo más reciente ha demostrado que la subunidad $K_v7.4$ se expresa en alrededor de un 10% de las neuronas de ganglio de la raíz dorsal de ratón (Heidenreich y cols, 2011). La expresión funcional de los canales K_v7 también se ha demostrado en neuronas nociceptivas de **ganglio trigémino** (Abd-Elsayed y cols, 2015; Ling y cols, 2018), en **fibras aferentes primarias** (Devaux y cols, 2004; King y Scherer, 2012; Passmore y cols, 2012; Rose y cols, 2011; Roza y cols, 2011) y en las **terminales periféricas nociceptivas** (Passmore y cols, 2012).

Los perfiles de expresión de las distintas subunidades de canales K_v7 en aferentes primarias de diferente modalidad sensorial todavía no están firmemente caracterizados, de hecho, existen algunas controversias. Rose y colaboradores (2011) indicaron que existe una mayor expresión de la subunidad $K_v7.2$ en neuronas de ganglio de la raíz dorsal de pequeño tamaño y, además, estos canales se expresan en aferentes primarias A δ y C (Passmore y cols, 2012). Sin embargo, King y colaboradores (2012) describieron que la subunidad $K_v7.2$ se expresan en mayor proporción en neuronas de tamaño grande que en neuronas de tamaño pequeño. Mientras que la subunidad $K_v7.5$ se expresa a niveles más altos en neuronas pequeñas y en fibras C. Estas controversias deberían intentar resolverse en futuros estudios. Determinar los perfiles de expresión exactos de subunidades K_v7 en las aferentes primarias de diferentes modalidades puede ser clave en el desarrollo de fármacos que actúen de manera específica sobre aferentes nociceptivos y se puedan utilizar para el tratamiento del dolor.

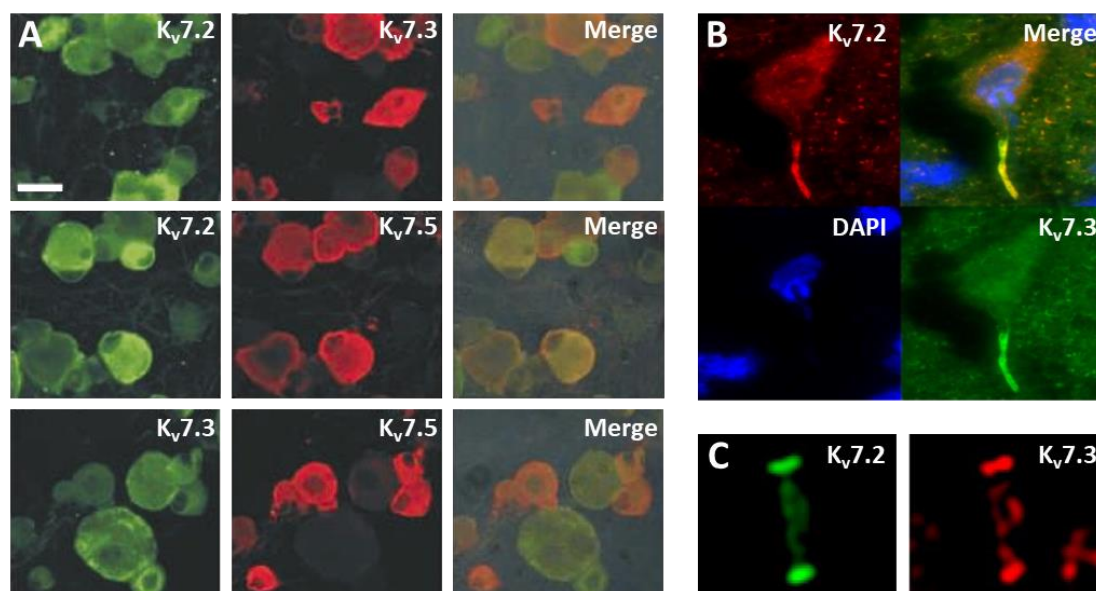


Figura 15. Expresión de canales K_v7 . Imágenes de inmunohistoquímica en las que se observa la expresión de diferentes subunidades de canales K_v7 en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (A), el segmento inicial del axón de motoneuronas de la médula espinal (B) y en nodos de Ranvier de nervio ciático (C). Barra de calibración 25 μ m. Modificado de Passmore y colaboradores (2003), Pan y colaboradores (2006).

En la **médula espinal**, los primeros que determinaron la presencia de los canales K_v7 fueron Dedek y colaboradores (2001), que demostraron la expresión de las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ mediante hibridación *in situ* en neuronas de la médula espinal de ratón, tanto en el asta dorsal como en el asta ventral. Un año más tarde, Alaburda y colaboradores (2002) registraron corriente M en motoneuronas de tortuga y demostraron que contribuye a la regulación de la excitabilidad de estas neuronas. Posteriormente, mediante técnicas de inmunohistoquímica se demostró la presencia de las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ en médula espinal de rata (Devaux y cols, 2004) y de ratón (Pan y cols, 2006), incluido el segmento inicial del axón de motoneuronas (ver figura 15). El segmento inicial del axón es la región donde se desencadena el potencial de acción. La presencia de canales de potasio en esta zona ejerce una influencia importante sobre el disparo de potenciales de acción y el disparo repetido en motoneuronas (Duflocq y cols, 2011). Los trabajos recientes de transcriptomas han demostrado que las subunidades $K_v7.2$, $K_v7.3$ y $K_v7.5$ se expresan en diferentes poblaciones de neuronas del asta dorsal de ratón, tanto inhibitorias como excitadoras (Häring y cols, 2018; Sathyamurthy y cols, 2018).

Función de los canales K_v7 en aferentes primarias y neuronas espinales

La evidencia experimental ha demostrado que los canales K_v7 tienen un papel importante en la regulación de la excitabilidad de las neuronas nociceptivas. Los bloqueantes de los canales K_v7 , linopirdina y XE-991, inhiben la corriente M en neuronas de ganglio de la raíz dorsal. Mientras que retigabina aumenta la corriente, hiperpolariza y eleva el umbral de disparo en estas neuronas (Passmore y cols, 2003). Varios trabajos sugieren que los canales K_v7 de las neuronas aferentes primarias son inhibidos por mediadores inflamatorios como proteasas (Linley y cols, 2008), bradicinina (Linley y cols, 2012; Liu y cols, 2010) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Barkai y cols, 2019). La aplicación de retigabina y flupirtina aumenta la corriente M inhibida por bradicinina, hiperpolarizando y reduciendo la hiperexcitabilidad neuronal inducida por bradicinina (Linley y cols, 2012).

Retigabina reduce la excitabilidad eléctrica de fibras C en el nervio sural humano (Lang y cols, 2008). En esta misma línea, la aplicación directa de retigabina en las terminales periféricas en una preparación de nervio-piel *in vitro* de rata, reduce significativamente las respuestas de las aferentes $A\delta$ al calor nocivo, y este efecto se ve revertido cuando se aplica XE-991. Retigabina también reduce las respuestas térmicas de las fibras C, aunque en menor medida (Passmore y cols, 2012). Posteriormente, Vetter y colaboradores (2013) utilizaron una preparación similar de nervio safeno de ratón y demostraron que el bloqueo de los canales K_v7 con XE-991 aumenta la respuesta al frío en una población de nociceptores C que expresan TRPM8, mientras que retigabina reduce estas respuestas. Los autores sugieren que las diferencias en cuanto a la sensibilidad de las fibras C a retigabina puede deberse a los distintos estímulos utilizados, que podría implicar una población de fibras diferentes, y/o una diferencia entre especies. Por otro lado, King y colaboradores (2014) utilizaron ratones mutantes condicionales de $KCNQ2$ y demostraron que la pérdida de actividad de los canales $K_v7.2$ aumenta la excitabilidad de las neuronas sensoriales primarias. Adicionalmente, la administración intraplantar de XE-991 aumenta la activación de las neuronas de amplio rango dinámico del asta dorsal en respuesta a la estimulación mecánica y térmica de la pata trasera en registros de médula espinal en ratas

anestesiadas (Passmore y cols, 2012). Por lo que la modulación farmacológica de los canales K_v7 periféricos se ve reflejada a nivel central.

Además de su influencia sobre neuronas aferentes primarias, varios trabajos sugieren que los canales K_v7 presentes a nivel espinal son muy relevantes para la transmisión nociceptiva. Passmore y colaboradores (2003) estudiaron las respuestas de neuronas del asta dorsal utilizando registros extracelulares *in vivo*. La aplicación de retigabina en la médula espinal inhibe la respuesta mediada por fibras $A\delta$ y C de las neuronas del asta dorsal a estímulos nocivos (eléctricos, mecánicos y térmicos), y también reduce el *wind-up* de estas neuronas inducido por la estimulación repetitiva en sus campos receptivos periféricos. Por su parte, Cai y colaboradores (2015) observaron un aumento de la activación de las neuronas de amplio rango dinámico del asta dorsal administrando XE-991 intratecal en ratas anestesiadas. El bloqueo de los canales K_v7 espinales genera un aumento significativo en las respuestas de estas neuronas a la estimulación de fibra C.

En una preparación de médula espinal *in vitro*, retigabina deprime los reflejos nociceptivos espinales y el *wind-up* en motoneuronas en respuesta a la estimulación eléctrica repetida de la raíz dorsal, mientras que XE-991 muestra el efecto opuesto (Rivera-Arconada y cols, 2004). Registros intracelulares *in vitro* de neuronas espinales muestran que retigabina hiperpolariza y reduce la excitabilidad intrínseca de neuronas del asta dorsal y motoneuronas (Rivera-Arconada y Lopez-Garcia, 2005) y también hiperpolariza las terminales centrales de las fibras aferentes primarias (Rivera-Arconada y Lopez-Garcia, 2006). Estos efectos son revertidos cuando se aplica XE-991. Sin embargo, la aplicación de XE-991 produce un aumento de la excitabilidad intrínseca de las motoneuronas mucho mayor que en neuronas del asta dorsal. Los autores sugieren que podría deberse a la expresión de diferentes subunidades de canales K_v7 en los distintos tipos de neuronas o a un diferente grado de activación de los canales en cada una de estas áreas. Estos resultados indican que la modulación de los canales K_v7 modifica la excitabilidad y la transmisión de información entre las neuronas espinales.

Implicación de los canales K_v7 en la nocicepción

La inhibición de los canales K_v7 mediante diferentes mediadores de inflamación contribuye al desarrollo de dolor inflamatorio (Barkai y cols, 2019; Linley y cols, 2008; Linley y cols, 2012; Liu y cols, 2010). Además, la inhibición farmacológica de los canales K_v7 en las terminales nociceptivas periféricas, producida por inyecciones intraplantares de XE-991, genera un dolor moderado en ratas (Linley y cols, 2008; Liu y cols, 2010), y la administración intraperitoneal de XE-991 genera alodinia mecánica (Zheng y cols, 2013). Los mutantes condicionales de KCNQ2 muestran un aumento de la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica, mientras que el rendimiento motor no se ve afectado (King y cols, 2014).

Por su parte, retigabina muestra efectos antinociceptivos en varios modelos de dolor inflamatorio, reduciendo la segunda fase del dolor inducida por formalina (Blackburn-Munro y Jensen, 2003) y la hiperalgesia inducida por carragenina (Passmore y cols, 2003). Por lo que los facilitadores de los canales K_v7 constituyen una alternativa interesante en el tratamiento del dolor inflamatorio. En ambos trabajos los efectos de retigabina son revertidos cuando se administra junto con XE-991. Retigabina también reduce la hiperalgesia térmica y mecánica en

diferentes modelos de dolor neuropático (Blackburn-Munro y Jensen, 2003; Dost y cols, 2004), y este efecto antinociceptivo es revertido por linopirdina (Dost y cols, 2004). Además, la hiperalgesia térmica producida por lesión neuropática se alivia mediante la aplicación de flupirtina directamente sobre el neuroma, efecto que se bloquea cuando se aplica con anterioridad XE-991 (Rose y cols, 2011). Los resultados obtenidos con los bloqueantes de canales K_v7 sugieren que los efectos analgésicos de retigabina y flupirtina en diferentes modelos de dolor están mediados por la modulación de los canales K_v7 .

Nuevos moduladores de los canales K_v7 también han mostrado efectos analgésicos en modelos animales. El compuesto QO-58 tiene eficacia analgésica en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Teng y cols, 2016; Zhang y cols, 2013), mientras que la administración oral e intraplantar de ICA-27243 tiene efectos analgésicos en varios modelos de dolor inflamatorio, aunque también produce un deterioro de la coordinación motora (Hayashi y cols, 2014). La administración intraperitoneal de SCR2682 alivia la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica en ratas sometidas al modelo CFA o SNI, con un efecto dependiente de la dosis, y sin afectar a la actividad motora. Además, la eficacia antinociceptiva de SCR2682 se revierte cuando se administra XE-991 (Wang y cols, 2021). La capacidad analgésica de nuevos facilitadores de los canales K_v7 , más selectivos sobre subunidades concretas y más potentes que retigabina y flupirtina, abre una posible puerta para el tratamiento de patologías que cursan con dolor crónico, reduciendo los efectos adversos no deseados que muestran los facilitadores clásicos.

Numerosos trabajos utilizando diferentes aproximaciones han permitido estudiar en más detalle los procesos en los que intervienen los canales K_v7 en diversos modelos de dolor. Roza y Lopez-García (2008) demostraron que retigabina reduce las respuestas a la estimulación mecánica y química (mediante compuestos inflamatorios) de fibras aferentes A δ y C axotomizadas, mientras que no observaron un efecto claro sobre las fibras intactas. Además, retigabina reduce la actividad espontánea en aferentes nociceptivas axotomizadas en una preparación de nervio-piel *in vitro* de ratón (Bernal y cols, 2016).

En un modelo de neuropatía diabética se ha mostrado una reducción de la densidad de corriente M y un aumento de la excitabilidad de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Yu y cols, 2018). En este mismo modelo, retigabina reduce la excitabilidad neuronal (Yu y cols, 2018) y alivia la hipersensibilidad al dolor (Djoughri y cols, 2019; Yu y cols, 2018), mientras que XE-991 muestra el efecto contrario (Yu y cols, 2018). De manera similar, en un modelo de dolor por cáncer de hueso se ha descrito un aumento de la excitabilidad de las neuronas de ganglio de la raíz dorsal debido a que se reduce la expresión de canales $K_v7.2$ y $K_v7.3$. En este trabajo, la aplicación sistémica de retigabina alivió la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica (Zheng y cols, 2013). En otro trabajo con este último modelo demostraron que se produce una sensibilización central de las neuronas de amplio rango dinámico del asta dorsal, que se reduce con la aplicación intratecal de retigabina. Además, retigabina alivia la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica que se observa en este modelo, reforzando la idea de la implicación de los canales K_v7 espinales (Cai y cols, 2015).

Son varios los trabajos que han demostrado cambios en la expresión de los canales K_v7 en situaciones de neuropatía. Diferentes modelos de neuropatía en ratas producen una reducción en la expresión de $K_v7.2$, tanto ARNm como proteína, en neuronas de ganglio de la raíz dorsal ipsilaterales a la lesión (Laumet y cols, 2015; Rose y cols, 2011). Resultados similares se

obtuvieron con el modelo SNI en ratones (Cisneros y cols, 2015). Además, en un modelo de neuropatía diabética se ha mostrado una disminución de ARNm y proteína de los canales $K_v7.2$, $K_v7.3$ y $K_v7.5$ en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Yu y cols, 2018). Por otro lado, también se ha observado una mayor acumulación de canales $K_v7.2$ en los neuromas formados tras la axotomía del nervio safeno (Cisneros y cols, 2015; Roza y cols, 2011). En estas condiciones se produce un reordenamiento de los canales $K_v7.2$ mediante un transporte axonal desde el soma (donde se reducen) hasta el neuroma (Cisneros y cols, 2015). Los autores sugieren que pueden representar una compensación homeostática de la hiperexcitabilidad en las aferentes primarias axotomizadas, abriendo una ventana para una acción periférica de los facilitadores de los canales K_v7 en condiciones de neuropatía.

En los últimos años se ha avanzado notablemente en la comprensión de la maquinaria molecular asociada con la reducción en la expresión de los canales K_v7 en neuronas aferentes primarias en situaciones patológicas. Los genes *KCNQ2*, *KCNQ3* y *KCNQ5* presentan sitios de unión al factor de transcripción REST. La sobreexpresión viral de REST en neuronas de ganglio de la raíz dorsal de pequeño tamaño reduce la densidad de corriente M y aumenta la excitabilidad de estas neuronas (Mucha y cols, 2010). La expresión de REST basal en estas neuronas es baja, pero aumenta considerablemente después de la inflamación (Mucha y cols, 2010). También aumenta después de una lesión neuropática, acompañado de una reducción en la expresión de canales $K_v7.2$ (Rose y cols, 2011). Por lo que parece que el aumento de la expresión de REST en condiciones patológicas es uno de los mecanismos que reduce la expresión de los canales K_v7 .

La evidencia experimental presentada demuestra la importancia que tienen los canales de potasio K_v7 en el control de la excitabilidad de las neuronas que forman parte del sistema nociceptivo. Alteraciones en el funcionamiento de estos canales generan situaciones de hiperexcitabilidad de estos circuitos y por consiguiente una situación patológica asociada con dolor. Por lo tanto, la actuación farmacológica sobre los canales K_v7 neuronales podría constituir un mecanismo eficaz para el tratamiento de enfermedades que cursen con dolor crónico.

Objetivos



El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido demostrar la importancia de los canales K_v7 como diana farmacológica en analgesia. Por un lado, la corriente M de potasio juega un papel muy importante en la regulación de la excitabilidad neuronal. Por otro lado, la médula espinal es una región de especial interés para la actuación farmacológica en el tratamiento de patologías que cursen con dolor, ya que constituye el primer centro de relevo de la información nociceptiva. Se ha demostrado que facilitadores específicos de los canales K_v7 son capaces de reducir la excitabilidad neuronal en diferentes elementos de las vías nociceptivas, incluidas neuronas de la médula espinal, además de mostrar efectos analgésicos en modelos animales de inflamación y neuropatía.

Dentro de este objetivo principal, se han planteado dos objetivos específicos:

I. Estudiar los efectos de moduladores selectivos de subunidades concretas de canales K_v7 en la médula espinal

El diseño de facilitadores de canales K_v7 más potentes y selectivos sobre subunidades concretas podría permitir la actuación farmacológica sobre las vías nociceptivas, evitando efectos no deseados debido a la presencia de estos canales en otros tejidos. Hemos estudiado las acciones de los nuevos moduladores de canales K_v7 , ICA-069673 y ML213, sobre las respuestas reflejas espinales mediante registros electrofisiológicos en médula espinal *in vitro*. Con el objetivo de caracterizar estas nuevas herramientas farmacológicas en términos de eficacia, especificidad y potencia.

II. Estudiar los efectos de fármacos analgésicos en la transmisión nociceptiva espinal y la posible implicación de los canales K_v7

Con el fin de validar los canales K_v7 como diana farmacológica en la médula espinal, estudiamos los efectos en la transmisión nociceptiva espinal de tres fármacos con actividad analgésica: los antiinflamatorios diclofenaco y celecoxib, además de flupirtina, un modulador de los canales K_v7 . Hemos utilizado registros de reflejos espinales en médula espinal *in vitro*, así como registros extracelulares de neuronas del asta dorsal para estudiar los efectos de estos fármacos específicamente en neuronas sensoriales. Además, para comprobar si los canales K_v7 podrían estar implicados en las propiedades analgésicas de diclofenaco y celecoxib, estudiamos los efectos de estos fármacos tras el bloqueo de los canales K_v7 con el bloqueante específico XE-991.

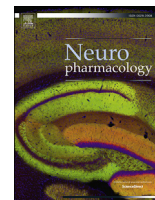
Resultados



Capítulo 1

Effects of novel subtype selective M-current activators on spinal reflexes *in vitro*: Comparison with retigabine





Effects of novel subtype selective M-current activators on spinal reflexes *in vitro*: Comparison with retigabine



Jorge Vicente-Baz, Jose A. Lopez-Garcia, Ivan Rivera-Arconada*

Department of Systems Biology (Physiology), Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2015

Received in revised form

28 April 2016

Accepted 31 May 2016

Available online 2 June 2016

Keywords:

ML213

ICA-069673

KCNQ channels

M-current

Pain

ABSTRACT

The activation of Kv7 channels and the resulting M-current is a powerful mechanism to control neuronal excitability with profound effects in pain pathways. Despite the lack of specific data on the expression and role of these channels in nociceptive processing, much attention has been paid at exploring their potential value as targets for analgesia. Here we have characterized the spinal actions of two novel subunit selective Kv7 activators, ICA-069673 and ML213, and compared their effects to those of retigabine that acts with similar affinity on all neuronal Kv7 channels.

Spinal reflexes were recorded in a mouse spinal cord *in vitro* preparation to allow the testing of the compounds on native spinal pathways at known concentrations. As retigabine, novel compounds depressed spinal segmental transmission with particularly strong effects on wind up, showing an adequate pro-analgesic profile. ML213 presented the highest potency. In contrast to retigabine, the effects of ICA-069673 and ML213 were blocked by XE-991 even at the highest concentrations used, suggesting specific effect on Kv7 channels. In addition, the effects of ICA-069673 on repetitive stimulation are consistent with a mode of action involving state or activity dependent interaction with the channels.

Compared to retigabine, novel Kv7 openers maintain strong depressant effects on spinal nociceptive transmission showing an improved specificity on Kv7 channels. The differential effects obtained with these Kv7 openers may indicate the existence of several Kv7 conformations in spinal circuits.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Homo- and hetero-tetrameric conformations of neuronal Kv7 channels (Kv7.2-5) yield outward potassium currents that exhibit unique low-threshold non-inactivating properties (M-currents or I_M) (Brown and Adams, 1980). Due to these special characteristics, Kv7 channels participate in the maintenance of resting membrane potential as well as the regulation of neuronal action potential firing and synaptic function. Neuronal Kv7 channels have been extensively studied in the context of pathologies originated by neuronal hyperexcitability like myokimia and epilepsy (Dedek et al., 2001; Jentsch, 2000). In addition, Kv7 channel activation has been proved as a useful strategy for alleviation of chronic pain in animal models (Blackburn-Munro and Jensen, 2003; Dost et al., 2004; Passmore et al., 2003; Rostock et al., 1996).

The most studied Kv7 opener retigabine has been patented for

the treatment of neuropathic pain (Wickenden et al., 2004) and flupirtine, a structural analog, is a centrally acting analgesic of clinical use (Szelenyi, 2013). Unfortunately, these openers do not possess selectivity for any particular subunit of Kv7 channels and do show nonspecific effects on other targets like GABA receptors (Rundfeldt and Netzer, 2000a; see also Mani et al., 2013). This lack of selectivity precludes the possibility of attributing particular behavioural effects to concrete channel conformations and may lead to undesirable effects such as motor and cognitive impairments (Jepps et al., 2013; Porter et al., 2012). Previous studies from our laboratory show that retigabine depresses spinal nociceptive reflexes and wind up acting on both sensory and motor neurons (Rivera-Arconada et al., 2004). However the reduced ability of the Kv7 channel blocker XE-991 to affect the excitability of dorsal horn neurons and dorsal roots compared to motor neurones suggests differences in Kv7 channel composition between sensory and motor areas (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005, 2006).

In the present work, we perform a pharmacological characterization of two novel subunit-selective Kv7 openers (ICA-069673 and ML213) and a comparison with the pan-neuronal Kv7 opener

* Corresponding author. Dpt. Biología de Sistemas (Área Fisiología), Edificio de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, 28871, Madrid, Spain.

E-mail address: ivan.rivera@uah.es (I. Rivera-Arconada).

retigabine using an *in vitro* spinal cord preparation, a model that allows assessing the effects of the modulators on the excitability of nociceptive and non-nociceptive pathways. ICA-069673 and ML213 were initially presented as specific Kv7.2/3 and Kv7.2-Kv7.4 channel openers respectively (Amato et al., 2011; Yu et al., 2011) although they may act on other channel subunits as well (Brueggemann et al., 2014). We have characterized these novel pharmacological tools and tried to find clues about Kv7 channels conformations expressed in spinal cord circuits which underlay nociceptive and non-nociceptive transmission. To this purpose the compounds were applied at known concentrations to the spinal cord and their effects on key parameters defining spinal processing of somatosensory information were quantitatively analysed.

2. Materials and methods

Experiments were made on CD1 mice pups (6–12 day old) of either sex weighing between 3.8 and 6.5 g following European Union and Spanish Government regulations of animal handling. All experimental protocols were approved by the local Ethics Committee. The number of animals used was reduced to the minimum that allowed a clear interpretation of the results and showed statistically significant differences. All efforts were made to minimise animal suffering.

2.1. *In vitro* spinal cord preparation, stimulation and recording

Animals were anaesthetised with urethane (2 g/Kg i.p.) and their spinal cords extracted following a rostrocaudal laminectomy (Rivera-Arconada et al., 2004). The entire cord was placed in cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) to remove outer meninges and then pinned down to a Sylgard based recording chamber. The preparation was maintained with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) ACSF at room temperature (22 ± 1 °C). Flow rate was maintained at 5 ± 1 ml/min. The composition of the ACSF in mM was: NaCl 127, KCl 1.9, KH₂PO₄ 1.5, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 22, glucose 10, (pH 7.4).

A lumbar dorsal root (L4-L5) and its corresponding ventral root were placed in tight fitting glass suction electrodes, and used for electrical stimulation of afferent fibres and for recording ventral root responses, respectively. The electrical stimulation test consisted of a series of pulses of 200 µs duration and increasing intensities to recruit progressively the different primary afferent types within the root, followed by a train of 15 consecutive C-fibre intensity stimuli applied at 1 Hz (200 µA, 200 µs) to produce wind up responses. Single stimuli within the test were applied at 45 s intervals and stimulation tests were applied at 30 min intervals.

Signals from the ventral root were obtained using a Multiclamp 7 A (Molecular Devices, California, USA), sampled at 6 KHz and stored for analysis using Spike 7 software (CED, Cambridge, UK). Depolarisations and hyperpolarisations of motoneuronal populations were recorded in DC channel. In order to record fast spike-like events produced by the firing of action potentials of motor neurons, this original DC signal was digitally band-pass filtered between 200 and 1500 KHz to obtain an AC channel (Rivera-Arconada et al., 2004). Single stimuli elicited (1) a ventral root reflex (MSR) originated by the monosynaptic activation of motoneuronal population in response to activation of thick myelinated fibres followed by (2) a ventral root potential of polysynaptic origin that augmented in magnitude as stimulus intensity increased and was associated with spike firing in the AC channel. Repetitive dorsal root stimulation at C-fibre intensity produced a cumulative depolarisation recorded in the DC channel, and spike wind up recorded in the AC channel (Rivera-Arconada et al., 2016).

2.2. Drugs, chemicals and experimental protocols

The Kv7 potassium channel openers *N*-(2,4,6-Trimethylphenyl)-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide (ML 213) and *N*-(2-Chloro-5-pyrimidinyl)-3,4-difluorobenzamide (ICA-069673) were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). *N*-(-2-amino-4-(4-fluorobenzylamino)-phenyl)carbamic acid ethyl ester (Retigabine) and 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone (XE-991) were kindly donated by NeuroSearch AS (Ballerup, Denmark). All the components for the ACSF were purchased from Sigma-Aldrich (Spain).

The ACSF was freshly prepared for each experiment. Drugs were dissolved in DMSO as concentrated stocks (10–30 mM) and diluted in ACSF to the final concentration just prior to use.

Drug perfusion was carried out after at least 2 control tests showing less than 15% variation in spike counts to repetitive stimulation. Then the test compounds were applied for 25 min periods at a single concentration or in a cumulative schedule including up to 3 concentrations. Application timing was arranged so as to perform the electrical stimulation test at the end of the superfusion of the compounds. To test if modulators acted on targets other than Kv7 channels, occlusion experiments were made with the Kv7 blocker XE-991. This compound was applied at 10 µM for 1 h to prevent channel opening and then the three higher concentrations of the test compounds were presented in a cumulative schedule (3–30 µM for retigabine and ICA-069673; 1–10 µM for ML213).

2.3. Data analysis

Basal potential of the ventral root was used to obtain an estimation of putative changes in motoneuronal membrane potential as a consequence of drug application. Spontaneous activity, reflecting the intrinsic activation of spinal circuits converging onto motoneurons, was analysed in terms of mean frequency and amplitude of events.

For quantification of responses to dorsal root stimulation in the DC channel, the integrated area of ventral root potentials to single and repetitive stimuli (4 and 24 s, respectively) was measured. The amplitude of the monosynaptic reflex was measured in responses to single high intensity stimuli (200 µs and 200 µA). Amplitudes of the response to each stimulus of the train were also analysed.

AC recordings were analysed based on threshold criteria to count spikes in response to single and repetitive stimulation. Spike counts for each stimulus of the train were measured in a window between 100 and 985 ms from stimulus artefact. For single stimuli spikes were counted in the 4 s following the stimulus artefact.

The slope of the cumulative depolarisation (and spike wind up index) was calculated as the difference in amplitude (spike counts) between the responses to the last and second stimuli of the train divided by 13 s and expressed in µV (spikes) per second.

All statistical analysis and curve fitting were carried out using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, USA). Data is represented as mean ± SEM unless otherwise stated. Comparisons of means were performed on raw data using paired *t*-test. Repeated measures ANOVA or Kruskal-Wallis test, as appropriated, were used for analysing concentration-dependent effects of Kv7 channel modulators. Two-Way ANOVA followed by Bonferroni post-tests was used when comparing responses to different stimulation intensities and effects on each individual stimulus of the train. Concentration-response curves were constructed with normalised data and fitted to a sigmoidal curve.

3. Results

3.1. Effects of the modulators on basal potential and spontaneous activity

In the absence of exogenous stimulation, DC recordings from the ventral root showed a stable basal potential as well as spontaneous activity consisting in single depolarising events or bursts, occasionally associated to spiking activity in the AC channel. Under control conditions, spontaneous activity showed a mean frequency of 62 ± 5 events/min (range 7–136) and a mean amplitude of 144 ± 9 μ V (range 50–330; $n = 51$).

All compounds produced concentration-dependent hyperpolarising effects (Fig. 1A). Retigabine hyperpolarised the basal potential with an EC_{50} of 0.8 μ M ($\log EC_{50} -6.09 \pm 0.18$). Equivalent EC_{50} values obtained for ICA-069673 and ML213 were 2.3 ($\log EC_{50} -5.63 \pm 0.26$) and 0.4 μ M ($\log EC_{50} -6.39 \pm 0.24$), respectively. Applications of retigabine at 10 μ M produced a mean hyperpolarisation of 0.59 ± 0.05 mV (range 0.4–0.7 mV, $n = 6$). Similar effects were produced by 10 μ M ICA-069673 (0.48 ± 0.05 mV, range 0.35–0.65 mV, $n = 5$; Fig. 1B) and 1 μ M ML213 (0.73 ± 0.09 mV, range 0.4–0.9 mV, $n = 5$).

Application of the Kv7 blocker XE-991 (10 μ M) caused a mean depolarisation of the basal potential of 0.71 ± 0.10 mV ($n = 10$) and prevented any subsequent effects of Kv7 activators on this parameter.

The frequency of the spontaneous activity was significantly reduced after application of the Kv7 openers retigabine (10 μ M, from 48 ± 18 to 18 ± 6 events/min, $n = 7$, $p < 0.05$), ICA-069673 (10 μ M, from 37 ± 10 to 10 ± 2 events/min, $n = 7$, $p < 0.05$) and ML213 (1 μ M, from 56 ± 11 to 15 ± 3 events/min, $n = 6$, $p < 0.05$). The amplitude of single spontaneous events was normally increased after application of the Kv7 modulators whereas spontaneous bursts were completely blocked (see Fig. 1). Spontaneous activity showed partial recovery within 30 min of washout of retigabine and ICA-069673 applied at 30 μ M, but no recovery was evident following applications of 10 μ M ML213.

XE-991 didn't show clear effects on spontaneous activity, but prevented the effects of Kv7 activators.

3.2. Effects of the modulators on responses to single stimulation of the dorsal root

The integrated area of ventral root potential as well as the associated firing of spikes recorded in the AC channel increased

with stimulus intensity. At the maximal intensity used (200 μ s and 200 μ A), mean values of 1.6 ± 0.1 mV*s and 227 ± 30 spikes were obtained ($n = 50$, see examples in Fig. 2).

The effects of the compounds on responses to single dorsal root stimuli are summarised in Fig. 2 and Supplementary Material. The integrated area of the ventral root potential was significantly reduced by retigabine and ICA-069673 with EC_{50} values of 3.8 μ M and 3.4 μ M respectively ($\log EC_{50} -5.42 \pm 0.14$ and -5.47 ± 0.15). The corresponding EC_{50} values for depression of spike counts were 3.1 μ M for retigabine and 5.8 μ M for ICA-069673 ($\log EC_{50} -5.51 \pm 0.28$ and -5.24 ± 0.32). ML213 was more potent, showing EC_{50} of 0.4 and 0.9 μ M for integrated area and spike counts, respectively ($\log EC_{50} -6.43 \pm 0.14$ and -6.06 ± 0.18). These effects were maximal during drug application and showed a substantial recovery after 2 h of washout (not shown).

Depressant effects of retigabine (10 μ M), ICA-069673 (10 μ M) and ML213 (1 μ M) were independent of stimulus intensity (see Fig. 2D and E). However, the effect of ICA-069673 on integrated area was significantly lower than those of retigabine and ML213 (see Fig. 2D; Two-Way ANOVA, $p < 0.001$).

XE-991 potentiated responses to single stimuli, showing stronger effects on spike counts than on integrated area. For responses to high intensity stimuli (200 μ s and 200 μ A), the integrated area increased from 1.4 ± 0.14 mV*s in control to 1.7 ± 0.1 mV*s after XE-991 ($n = 10$; $p < 0.01$) and spike counts from 133 ± 41 in control to 891 ± 106 after XE-991 ($n = 11$; $p < 0.001$). XE-991 prevented any depressant effects of ICA-069673 and ML213 on both parameters. In contrast, high concentrations of retigabine (30 μ M) still produced a significant reduction of spike counts in responses to single stimuli ($p < 0.01$; $n = 4$; Supplementary Material).

The mean amplitude of the MSR in control ACSF was 3.7 ± 0.4 mV ($n = 50$, see Fig. 3). Retigabine was devoid of effect on the MSR at the concentration range tested. However, ICA-069673 applied at 30 μ M and ML213 applied at 3 and 10 μ M had depressant effects on the MSR (Fig. 3).

XE-991 did not change significantly the amplitude of the MSR (from 4.3 ± 0.5 mV in control to 5.0 ± 0.5 mV after XE-991; $n = 11$), but prevented the depressant effects of ICA-069673 and ML213 ($n = 4$ and 3 , respectively).

3.3. Effects of the modulators on responses to repetitive stimulation of the dorsal root

Repetitive stimulation of the dorsal root at stimulus intensities activating C-fibres produced a cumulative depolarisation and wind

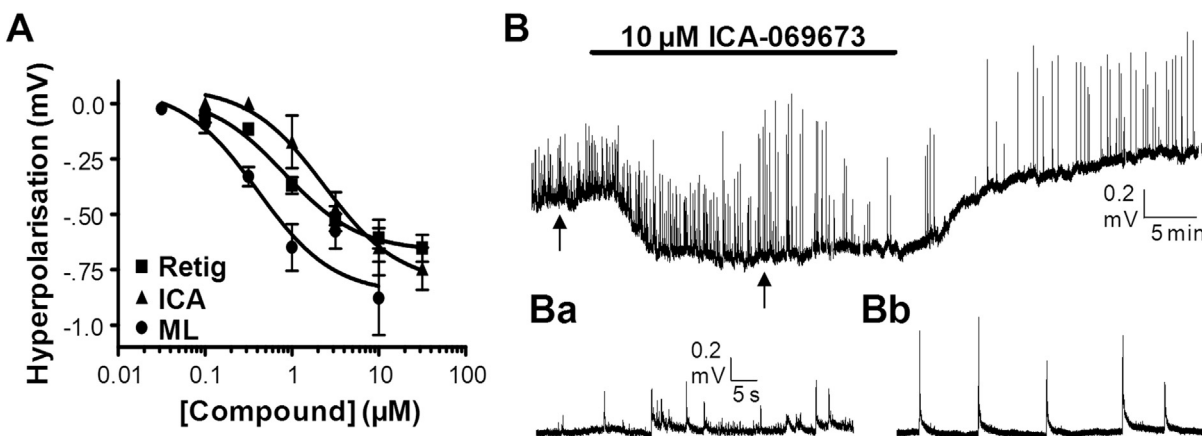


Fig. 1. Kv7 channel activators altered ventral root basal potential and spontaneous activity. Graph in **A** shows concentration-dependent effects of activators on basal potential (2–6 observations per data point). Recording in **B** shows the basal potential of the ventral root before, during and after the perfusion of ICA-069673 (10 μ M) indicated by the black bar. **Ba** and **Bb** show expanded records from **B** at the time marked by arrows. Note the depression of burst-like activity and the increase in amplitude of singular events produced by ICA-069673.

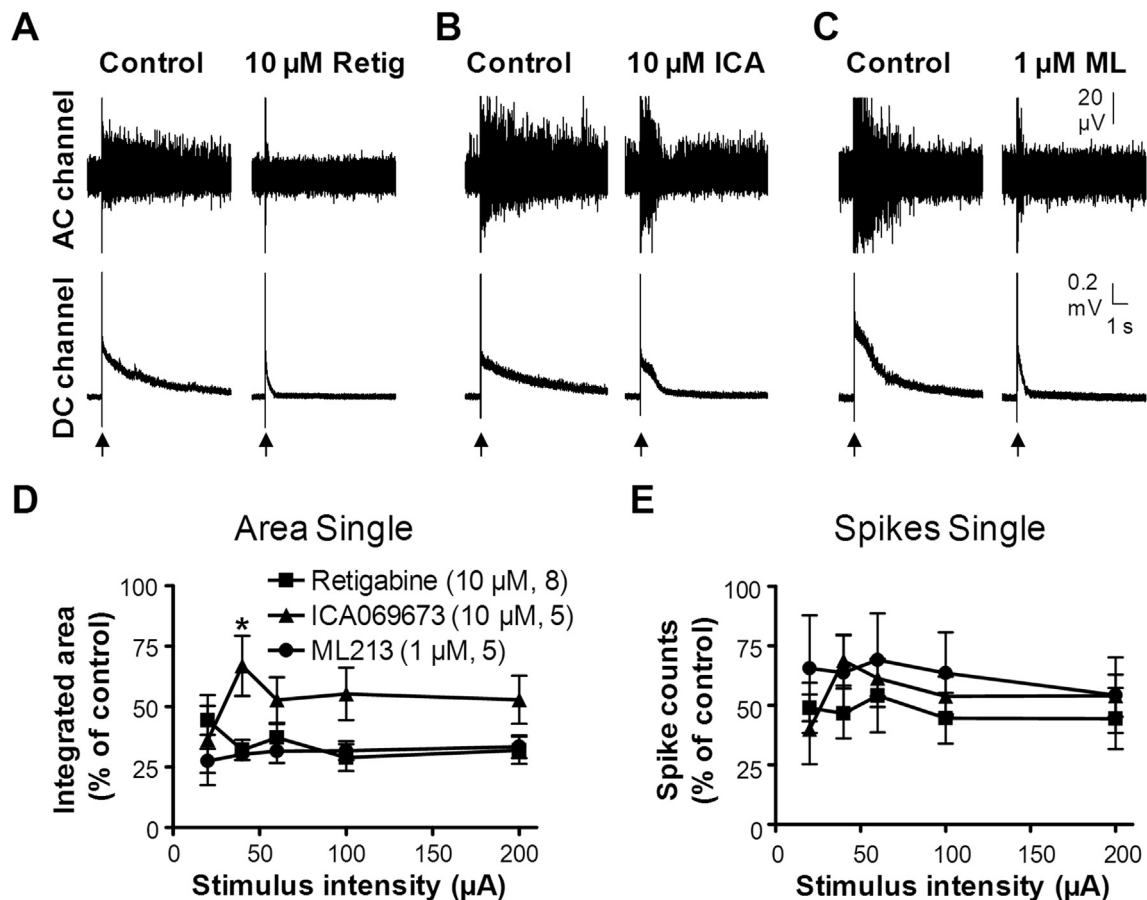


Fig. 2. Effects of Kv7 channel activators on single dorsal root evoked ventral root reflexes. Original recordings obtained after high intensity stimulation (200 μ A; 200 μ s) show the reduction in spike counts (AC channel) and area of depolarisation (DC channel) produced by retigabine (A), ICA-069673 (B) and ML213 (C) at the concentrations stated. Arrows mark the stimulus artefact; calibration bars in C apply to all recordings. Graphs in D and E show a quantification of the effects of modulators on integrated area and spike counts of responses to single stimuli of increasing intensity (X axis) and fix duration (200 μ s). Numbers in parenthesis indicate concentration of each compound and number of observations. ICA-069673 showed significantly lower effects on the depolarised area (Two-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test, * $p < 0.05$).

up of action potentials in ventral root recordings indicative of short-term plasticity (Fig. 4A and B, left panels). The mean integrated area of the cumulative depolarisation was 9.2 ± 0.6 mV*s, and the mean number of spike counts was 1688 ± 168 spikes ($n = 50$).

Application of the modulators produced depressant effects on responses to repetitive stimulation (Fig. 4). Fig. 5 summarises the main effects of Kv7 openers on cumulative depolarisation and spike wind up at the range of concentrations tested. All compounds produced a strong reduction of spike wind up and cumulative depolarisation. On the basis of EC_{50} values obtained, the rank order of potency of compounds on responses to repetitive stimuli was $ML213 > Retigabine \geq ICA-069673$.

In addition, compounds depressed the slope of the cumulative depolarisation and the spike wind up index (Table 1) indicating a blockade of the summation effect obtained upon repetitive stimulation. ICA-069673 was found to produce strong negative slope values reflecting a wind down of responses.

Blockade of Kv7 channels with XE-991 (10 μ M) produced a significant increase in the responses to repetitive stimulation. The area of the cumulative depolarisation increased from 7.8 ± 0.7 mV*s in control to 9.4 ± 0.5 mV*s after XE-991 ($n = 10$; $p < 0.01$) and spike counts from 801 ± 208 in control to 4129 ± 354 after XE-991 ($n = 11$; $p < 0.001$). Application of XE-991 increased the slope of the cumulative depolarisation, but failed to produce significant effects on wind up index (see Table 1). Under continuous perfusion of XE-991 neither ICA-069673 nor ML213 showed any depressant effect

on responses to repetitive stimulation of the dorsal root (Figs. 4C and 5). In contrast, retigabine applied at 30 μ M produced a significant decrease in total integrated area and spike counts, but showed no effect on slope and wind up index ($p < 0.05$ and 0.01, respectively; Repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post-test; see Fig. 5 and Supplementary Material).

4. Discussion

In the present study, novel compounds acting on neuronal Kv7 channels were tested for their capacity to modulate spinal reflexes *in vitro* in comparison with the reference compound retigabine. Results obtained show a good degree of coincidence between the effects of the compounds as well as certain differences. The present data indicate that ICA-069673 and ML213 acted specifically on Kv7 channels at all concentrations tested whereas retigabine may not be selective at high concentration. ICA-069673 also showed a mode of action different to that of retigabine and ML213. In addition, the differences obtained in the potency of these compounds may help to gain insight about the Kv7 channel subunit arrangements involved in the regulation of spinal reflexes.

The present results support the idea that the novel compounds present an improved specificity on Kv7 channels over retigabine. After channel blockade with XE-991 neither ICA-069673 nor ML213 affected spinal reflexes to any extent. In contrast, 30 μ M retigabine significantly reduced reflexes recorded under these conditions.

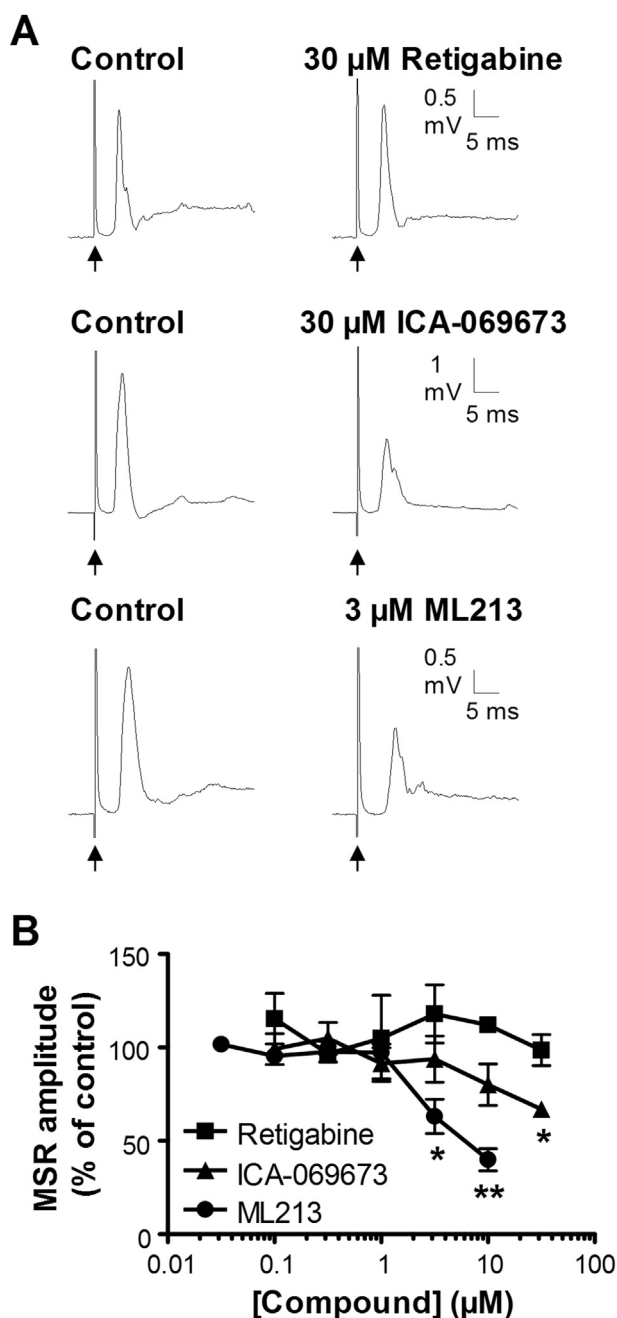


Fig. 3. Effects of Kv7 activators on the monosynaptic reflex. The recordings in **A** show the first milliseconds of the response to a single dorsal root stimulus of high intensity (200 μA ; 200 μs). ICA-069673 (30 μM) and ML213 (3 μM) strongly depressed the amplitude of the response, whereas retigabine (30 μM) was devoid of effect. Graph in **B** shows a quantification of the effects of the compounds on the monosynaptic reflex at a range of concentrations (3–5 observations per data point). Note the lack of effect of retigabine at the concentrations tested. Statistically significant differences were obtained from normalised data using Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Retigabine applied at high concentrations has been reported to exert nonspecific effects on GABA receptors and L-type calcium channels (Mani et al., 2013; Rundfeldt and Netzer, 2000a). As expected from previous data on the pharmacological profile of the compounds, ML213 was most potent at reducing spinal reflexes with EC_{50} values tenfold lower those of retigabine and ICA-069673.

In addition, we have found that ICA-069673 had a progressive

depressant action on responses to repetitive stimulation, with very little effect on the first responses of the train of stimuli and a much stronger action on later stimuli. This suggests an activity-dependent mode of action for this compound, perhaps implying a state or voltage dependent action. It has been reported that ML213 and retigabine bind to a tryptophan residue located in the pore domain segment of Kv7 channels, whereas ICA-069673 (a gating modifier modulator) may recognise various residues in the voltage-sensing domain (Brueggemann et al., 2014; Schenzer et al., 2005; Tatulian et al., 2001). The mode of action of ICA-069673 on Kv7 channels represents a potentially interesting way to interfere with spinal cord transmission, since it could reduce excessive excitability after strong and repetitive activation of nociceptive pathways with minor interference on acute transmission (Mazo et al., 2015).

The scarce information available on the expression of Kv7 channels in the spinal cord and the similar affinity of retigabine on neuronal Kv7 subunits has made impossible to elucidate the configurations implicated in nociception and the cellular elements responsible. By using subunit selective openers, it could be possible to assign a particular function to specific Kv7 configurations. However, the existing data on EC_{50} values for the current compounds on homo- and heteromeric Kv7 channel configurations are rather incomplete and obtained with different procedures which are not always comparable. We have tried to reconcile the available data on pharmacological studies for retigabine, ICA-069673 and ML213 with the results obtained here to find clues that may allow hypothesising the Kv7 conformations expressed in nociceptive and non-nociceptive spinal pathways. In order to facilitate the discussion of the present results we have built Table 2 which summarises EC_{50} values as reported in the literature, as well as the values that we have obtained in the present work for variables of major interpretative interest related to segmental spinal processing.

Existing data on expression of Kv7 channel subunits in the spinal cord indicate that 2 and 3 subunits are probably the most abundantly expressed. By using northern blot, a low expression of Kv7.2 and 3 in the spinal cord was initially reported (Biervert et al., 1998; Smith et al., 2001; Yang et al., 1998). However, using *in situ* hybridisation, Dedek et al. (2001) found both subunits in neurons from all areas of the spinal cord, although a description about cell types was not provided. Subsequently Kv7.2 and 3 subunits have been detected in the spinal cord by immunohistochemistry, mainly in axon initial segment of motoneurons (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006). Of note, the presence of these Kv7 channels was also reported in neurons of other central pain pathways like the trigeminal nucleus (Cooper et al., 2001; Saganich et al., 2001). It is generally accepted that Kv7.2/3 arrangements yield currents of higher magnitude than other configurations and are present in many CNS areas (Cooper et al., 2000; Wang et al., 1998).

The strong depression of spinal nociceptive transmission produced by all Kv7 openers in the present study likely reflects the accumulated effects of the compounds on several spinal neurones belonging to the somato-motor transmission chains. In addition, the similar magnitude of the effects suggests that the main configurations of Kv7 channels expressed in spinal neurones should be sensitive to all openers. As Table 2 shows, retigabine and ML213 act on several Kv7 conformations, but to date ICA-069673 has been shown to act on a more restricted number of Kv7 channel configurations, mainly Kv7.2/3. The values obtained here for wind up depression with ML213 and retigabine ($\approx 0.2 \mu\text{M}$ and $\approx 2 \mu\text{M}$) are well aligned with EC_{50} values obtained for these compounds in cells transfected with heteromeric Kv7.2/3 channels (Tatulian et al., 2001; Wickenden et al., 2000; Yu et al., 2011). Together these observations suggest that Kv7.2/3 channels may constitute the substrate of the M-currents in spinal neurones mediating spinal polysynaptic reflexes. However, ICA-069673 showed an EC_{50} value

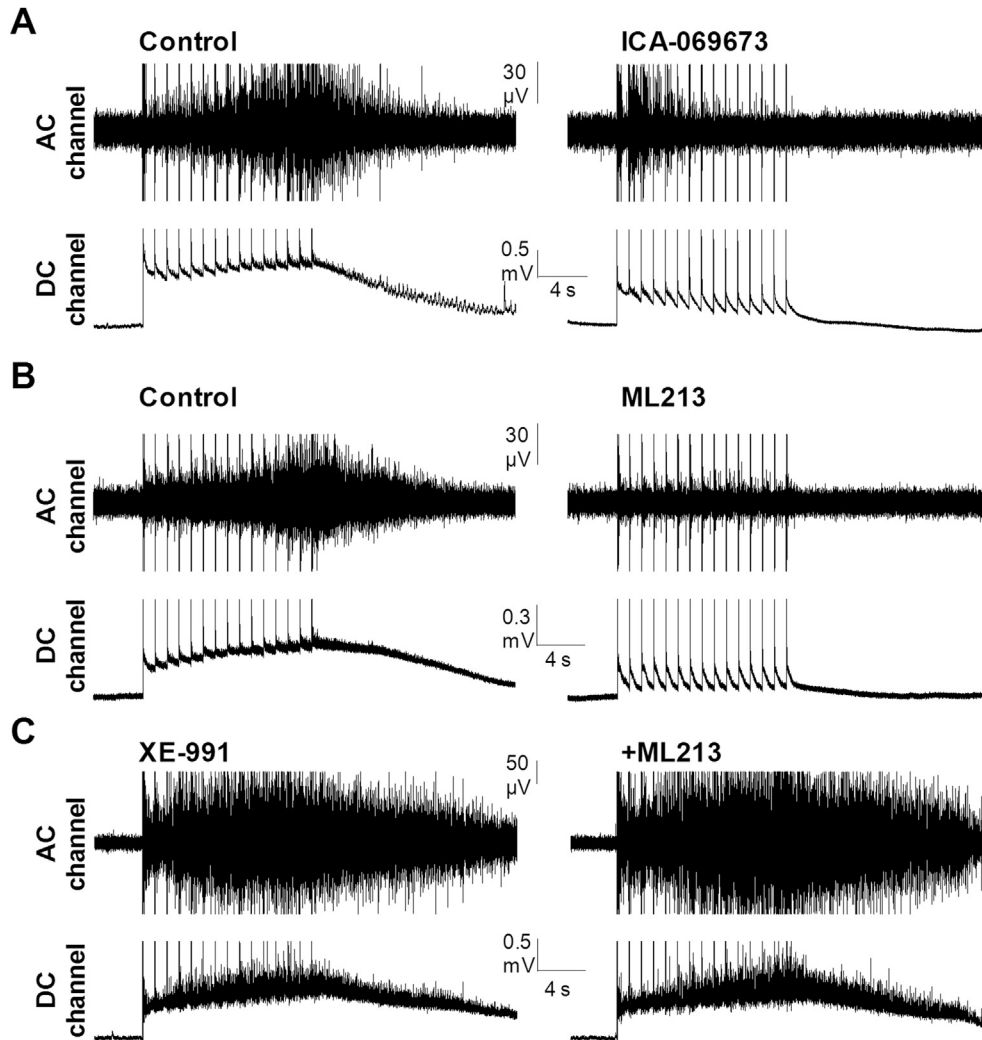


Fig. 4. Effects of Kv7 modulators on responses to repetitive stimulation of the dorsal root. In control conditions (left panels in A and B) repetitive dorsal root stimulation at C-fibre intensity (200 μ A; 200 μ s) evoked a cumulative depolarisation in the DC channel and the associated spike wind up visible in the AC channel (gradual thickening of baseline). Vertical lines at regular intervals correspond to stimulus artefacts. 10 μ M ICA-069673 (A) and 1 μ M ML213 (B) produced a strong reduction of both depolarisation and spike wind up, abolishing summation. Note the limited effects of ICA-069673 on the first part of the response as compared to ML213. Blockade of Kv7 channels with 10 μ M XE-991 increased responses to repetitive stimulation from control values (not shown). In the continuous presence of XE-991 the depressant effects of 10 μ M ML213 were abolished (C).

acting on Kv7.2/3 channels lower than the observed here (Amato et al., 2011). The available EC_{50} value for ICA-069673 acting on Kv7.2/3 channels is based on rubidium flux assays, that may not be directly comparable to those obtained for retigabine and ML213

using electrophysiological approaches. Alternatively, other Kv7 conformations with reduced sensitivity to ICA-069673 may be present in spinal cord circuits.

Previous studies have shown that several arrangements of Kv7

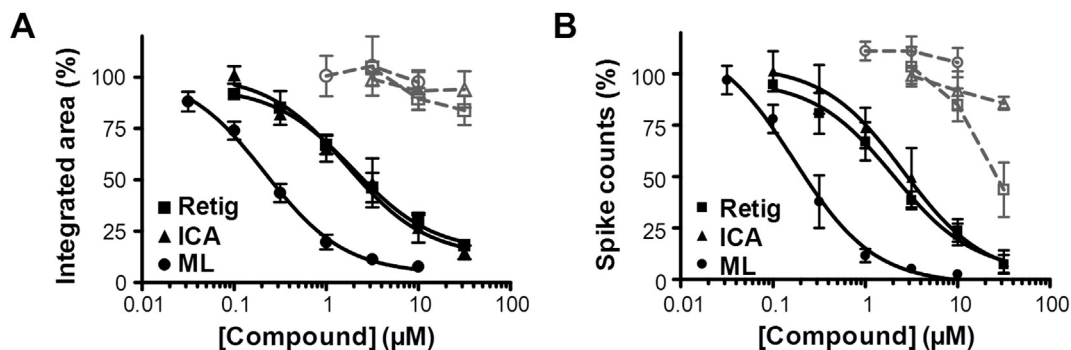


Fig. 5. Concentration-response curves for the effects of Kv7 modulators on responses to repetitive stimulation. Curves show reduction in area of cumulative depolarisation (A) and total spike counts (B) to a series of 15 stimuli and dashed lines correspond to data obtained in the presence of XE-991 10 μ M (3–5 observations per data point). XE-991 prevented the depressant effects of ICA-069673 and ML213, but not those of retigabine. For integrated area of the cumulative depolarisation EC_{50} values ($\log EC_{50} \pm SEM$) were 2.0 μ M (-5.70 ± 0.14) for retigabine, 1.7 μ M (-5.78 ± 0.17) for ICA-069673 and 0.2 μ M (-6.66 ± 0.10) for ML213. The corresponding values for total spike counts were 2.0 μ M (-5.69 ± 0.17) for retigabine, 2.6 μ M (-5.59 ± 0.20) for ICA-069673 and 0.2 μ M (-6.77 ± 0.16) for ML213.

Table 1
Effects of Kv7 channel modulators on the slope of the cumulative depolarisation and spike wind up index.

	Conc (μM)	n	Slope		Wind up index	
			Control	Drug	Control	Drug
Retigabine	10	9	9.0 \pm 1.6	0.9 \pm 0.4**	5.6 \pm 1.0	0.2 \pm 0.6**
ICA-069673	10	7	14.6 \pm 3.7	-4.4 \pm 3.0*	6.1 \pm 2.3	-2.1 \pm 0.9*
ML213	1	6	10.9 \pm 3.3	3.2 \pm 0.6*	5.4 \pm 1.4	-0.4 \pm 0.2**
XE-991	10	6	8.1 \pm 1.9	18.9 \pm 2.7**	6.0 \pm 1.4	8.2 \pm 1.4 ^{ns}

Conc stands for concentration of each compound in μM and **n** for number of observations. Slope of cumulative depolarisation is expressed as $\mu\text{V/s}$ and wind up index as spikes/s. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (paired *t*-test).

Table 2
 EC_{50} values obtained for activators on spinal function and reference EC_{50} values for activation of several Kv7 channel conformations as reported in the literature.

(MSR)	Wind up	Compound	Kv7 channel conformations				
			2	3	5	2/3	3/5
(NE)	2.0	Retigabine	*2.5 ¹ -4.1 ²	*0.6 ¹	+2 ³ -6.4 ⁴	*1.9 ¹ -1.6 ⁵ †1.7 ⁶	†1.4 ⁷
(3)	0.2	ML213	*0.33 ⁸ +0.23 ⁸		*4.5 ⁹ +0.7 ⁹	*0.37 ⁸	
(30)	2.6	ICA-069673			+inh ⁹	[0.69 ¹⁰]	[14.3 ¹⁰]

The values shown to the left of the table were obtained in this work and show EC_{50} values (wind up) or minimum effective concentrations (MSR) in μM (see Fig. 3B). NE stands for no effect at the maximal concentration tested.

Values to the right were extracted from previous publications. Asterisks mark EC_{50} values obtained for Kv7 opener-induced displacement in V_{50} . Plus signs indicate values obtained using the increase in maximal current recorded. Dagger symbols indicate values obtained using the increase in sustained current measured at hyperpolarised potentials (-50 and -40 mV). Values in brackets were obtained using rubidium flux assay. ICA-069673 at 100 μM inhibited currents through Kv7.5 channels (indicated by "inh").

References cited in table: 1.- Tatulian et al. (2001); 2.- Wuttke et al. (2005); 3.- Jensen et al. (2005); 4.- Yeung et al. (2008); 5.- Wickenden et al. (2000); 6.- Rundfeldt and Netzer (2000b); 7.- Wickenden et al. (2001); 8.- Yu et al. (2011); 9.- Brueggemann et al. (2014); 10.- Amato et al. (2011)

are possible in others regions of the CNS (Saganich et al., 2001; Shah et al., 2002). The expression of homomeric Kv7.2 channels in the spinal cord is likely since the expression level of Kv7.3 subunits seems to be lower than that of Kv7.2 (Dedek et al., 2001; Devaux et al., 2004). This conformation is sensitive to retigabine and ML213 and there are no reports showing actions of ICA-069673 on it. However, two structurally related compounds also acting on the voltage sensor domain of Kv7 channels, ztz240 and ICA-27243, strongly increase currents produced by homomeric Kv7.2 channels, suggesting that ICA-069673 could also have effects not yet studied (Blom et al., 2010; Gao et al., 2010).

Among the remaining subunits, Kv7.1 channels are predominantly expressed in cardiac muscle cells and Kv7.4 subunits are located in neurons related to auditory pathways (Jentsch, 2000). To date, their presence in the spinal cord has not been reported. In contrast, Kv7.5 subunits are expressed in unmyelinated C-fibres and conformations including Kv7.5 channels (homomeric or heteromeric) are possible in the spinal cord (King and Scherer, 2012; Rivera-Arconada et al., 2009). Interestingly, a noticeable difference of ICA-069673 with the other compounds consists in the reduced affinity or even blocking effects on Kv7.5-containing conformations. Thus, channels yielded by homo and/or heteromeric configurations of Kv7.5 subunits may be implicated in spinal transmission being responsible for the discrepancy in the potency of ICA-069673. These configurations may introduce further heterogeneity in the M-like currents present in the spinal cord.

On the other hand, the monosynaptic reflex provides the opportunity to test the influence of the compounds on a purely non-nociceptive pathway. This response is originated by the activation of thick myelinated Ia afferents that make monosynaptic contacts with motor neurons. In our studies ML213 and ICA-069673 depressed the MSR, whereas retigabine was devoid of effect. This effect was prevented by XE-991 indicating a selective action on Kv7

channels. In our hands all three compounds hyperpolarised motor neurones and reduced segmental transmission to a similar extent, suggesting that the effects observed on the MSR may be due to specific actions on thick primary afferents. Retigabine acts on all neuronal Kv7 subunits with similar affinity, suggesting that RMS depression may result from strong effects of the novel compounds on certain Kv7 configurations present in thick afferents. In the sciatic nerve, large myelinated fibres express a slow potassium current that it's yielded by homomeric Kv7.2 channels (Schwarz et al., 2006). Contrary to retigabine, ML213 produce strong leftward shifts in the activation curve of Kv7.2 homomeric channels

and increase the maximum current (Schenzer et al., 2005; Tatulian et al., 2001; Wuttke et al., 2005; Yu et al., 2011). Thus, ML213 acting on homomeric Kv7.2 channels may alter the generation and/or the transmission of action potentials in thick afferent fibres affecting the MSR. As discussed above there is no information about putative effects of ICA-069673 on homomeric Kv7.2 channels, but such effect is likely.

5. Conclusions

The efforts put into the design of new molecules with activity on Kv7 channels have yielded several new compounds that present improved characteristics with regard to existing drugs, enhancing their potency and limiting the nonspecific effects on other targets. However, the compounds tested here still show lower than desired selectivity among Kv7 subunits. Despite this, the present results allow to make inferences on the putative subunit composition of the channels expressed in the spinal cord and hence related to nociceptive processing. Homo and/or heteromeric channels containing Kv7.2 subunits are likely the predominant configurations, with Kv7.5 subunits perhaps contributing to control the excitability in spinal circuits. Homomeric Kv7.2 channels could be the conformation present in non-nociceptive afferents. More selective modulators acting specifically on some of these conformations and avoiding modulation of Kv7.2 homomeric channels, could be interesting to improve the analgesic profile of Kv7 channel openers.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgements

Research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant No. BFU 2012-37905) and the University of Alcalá (Grant No. CCG2015/BIO-023).

Appendix A. Supplementary data

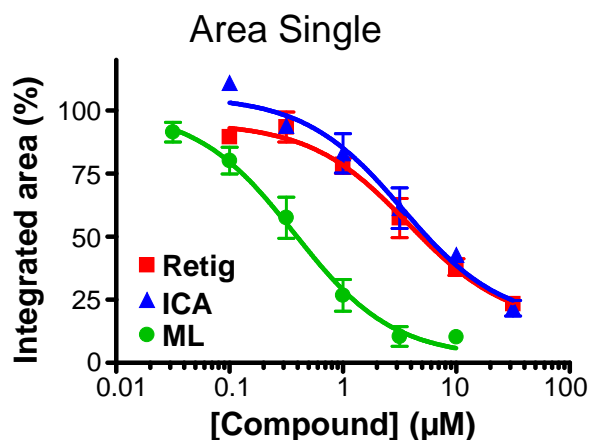
Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.025>.

References

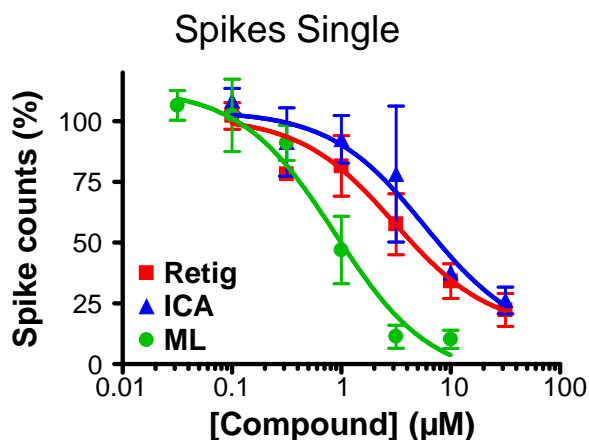
- Amato, G., Roeloffs, R., Rigdon, G.C., Antonio, B., Mersch, T., McNaughton-Smith, G., Wickenden, A.D., Fritch, P., Suto, M.J., 2011. N-pyridyl and pyrimidine benzamides as KCNQ2/Q3 potassium channel openers for the treatment of epilepsy. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 481–484. <http://dx.doi.org/10.1021/ml200053x>.
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403–406.
- Blackburn-Munro, G., Jensen, B.S., 2003. The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 460, 109–116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02924-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02924-2).
- Blom, S.M., Schmitt, N., Jensen, H.S., 2010. Differential effects of ICA-27243 on cloned K(V)7 channels. *Pharmacology* 86, 174–181. <http://dx.doi.org/10.1159/000317525>.
- Brown, D.A., Adams, P.R., 1980. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673–676. <http://dx.doi.org/10.1038/283673a0>.
- Brueggemann, L.I., Haick, J.M., Cribbs, L.L., Byron, K.L., 2014. Differential activation of vascular smooth muscle Kv7.4, Kv7.5, and Kv7.4/7.5 channels by ML213 and ICA-069673. *Mol. Pharmacol.* 86, 330–341. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.114.093799>.
- Cooper, E.C., Aldape, K.D., Aboosh, A., Barbaro, N.M., Berger, M.S., Peacock, W.S., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2000. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4914–4919. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.090992797>.
- Cooper, E.C., Harrington, E., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2001. M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J. Neurosci.* 21, 9529–9540. DOI:21/24/9529 [pii].
- Dedek, K., Kunath, B., Kananura, C., Reuner, U., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 2001. Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12272–12277. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.211431298>.
- Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S., 2004. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J. Neurosci.* 24, 1236–1244. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4512-03.2004>.
- Dost, R., Rostock, A., Rundfeldt, C., 2004. The anti-hyperalgesic activity of retigabine is mediated by KCNQ potassium channel activation. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 369, 382–390. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-004-0881-1>.
- Gao, Z., Zhang, T., Wu, M., Xiong, Q., Sun, H., Zhang, Y., Zu, L., Wang, W., Li, M., 2010. Isoform-specific prolongation of Kv7 (KCNQ) potassium channel opening mediated by new molecular determinants for drug-channel interactions. *J. Biol. Chem.* 285, 28322–28332. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.16392>.
- Jensen, H.S., Callo, K., Jespersen, T., Jensen, B.S., Olesen, S.P., 2005. The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 139, 52–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.05.007>.
- Jentsch, T.J., 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 21–30. <http://dx.doi.org/10.1038/35036198>.
- Jepps, T.A., Olesen, S.P., Greenwood, I.A., 2013. One man's side effect is another man's therapeutic opportunity: targeting Kv7 channels in smooth muscle disorders. *Br. J. Pharmacol.* 168, 19–27. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02133.x>.
- King, C.H., Scherer, S.S., 2012. Kv7.5 is the primary Kv7 subunit expressed in C-fibers. *J. Comp. Neurol.* 520, 1940–1950. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23019>.
- Mani, B.K., O'Dowd, J., Kumar, L., Brueggemann, L.I., Ross, M., Byron, K.L., 2013. Vascular KCNQ (Kv7) potassium channels as common signaling intermediates and therapeutic targets in cerebral vasospasm. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 61, 51–62. <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182771708>.
- Mazo, I., Roza, C., Zamanillo, Z., Merlos, M., Vela, J.M., Lopez-Garcia, J.A., 2015. Effects of centrally acting analgesics on spinal segmental reflexes and wind-up. *Eur. J. Pain* 19, 1012–1020. <http://dx.doi.org/10.1002/ejp.629>.
- Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., Cooper, E.C., 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and Nav channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci.* 26, 2599–2613. DOI:26/10/2599 [pii].
- Passmore, G.M., Selyanko, A.A., Mistry, M., et al., 2003. KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J. Neurosci.* 23, 7227–7236.
- Porter, R.J., Burdette, D.E., Gil-Nagel, A., Hall, S.T., White, R., Shaikh, S., DeRossett, S.E., 2012. Retigabine as adjunctive therapy in adults with partial-onset seizures: integrated analysis of three pivotal controlled trials. *Epilepsy Res.* 101, 103–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2012.03.010>.
- Rivera-Arconada, I., Lopez-Garcia, J.A., 2006. Retigabine-induced population primary afferent hyperpolarisation in vitro. *Neuropharmacology* 51, 756–763. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.05.015>.
- Rivera-Arconada, I., Lopez-Garcia, J.A., 2005. Effects of M-current modulators on the excitability of immature rat spinal sensory and motor neurones. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3091–3098. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04507.x>.
- Rivera-Arconada, I., Martinez-Gomez, J., Lopez-Garcia, J.A., 2004. M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* 46, 598–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.10.016>.
- Rivera-Arconada, I., Roza, C., Lopez-Garcia, J.A., 2016. Spinal reflexes and windup in vitro: effects of analgesics and anesthetics. *CNS Neurosci. Ther.* 22, 127–134. <http://dx.doi.org/10.1111/cns.12446>.
- Rivera-Arconada, I., Roza, C., Lopez-Garcia, J.A., 2009. Enhancing m currents: a way out for neuropathic pain? *Front. Mol. Neurosci.* 2, 10. <http://dx.doi.org/10.3389/fnro.02.010.2009>.
- Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., et al., 1996. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 23, 211–223. [http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211\(95\)00101-8](http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211(95)00101-8).
- Rundfeldt, C., Netzer, R., 2000a. Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung* 50, 1063–1070. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1300346>.
- Rundfeldt, C., Netzer, R., 2000b. The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci. Lett.* 282, 73–76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00866-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00866-1).
- Saganich, M.J., Machado, E., Rudy, B., 2001. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J. Neurosci.* 21, 4609–4624. DOI:21/13/4609 [pii].
- Schenzer, A., Friedrich, T., Pusch, M., Saftig, P., Jentsch, T.J., Grotzinger, J., Schwake, M., 2005. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J. Neurosci.* 25, 5051–5060. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0128-05.2005>.
- Schwarz, J.R., Glassmeier, G., Cooper, E.C., Kao, T.C., Nodera, H., Tabuena, D., Kaji, R., Bostock, H., 2006. KCNQ channels mediate I_{Ks}, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of ranvier. *J. Physiol.* 573, 17–34. <http://dx.doi.org/10.1111/jphysiol.2006.106815>.
- Shah, M., Mistry, M., Marsh, S.J., Brown, D.A., Delmas, P., 2002. Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 544, 29–37. DOI: PHY_028571 [pii].
- Smith, J.S., Iannotti, C.A., Dargis, P., Christian, E.P., Aiyar, J., 2001. Differential expression of kcng2 splice variants: implications to m current function during neuronal development. *J. Neurosci.* 21, 1096–1103. DOI:21/4/1096 [pii].
- Szelenyi, I., 2013. Flupirtine, a re-discovered drug, revisited. *Inflamm. Res.* 62, 251–258. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-013-0592-5>.
- Tatullian, L., Delmas, P., Abogadie, F.C., Brown, D.A., 2001. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J. Neurosci.* 21, 5535–5545.
- Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D., 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890–1893. <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5395.1890>.
- Wickenden, A.D., Roeloffs, R., McNaughton-Smith, G., Rigdon, G.C., 2004. KCNQ potassium channels: drug targets for the treatment of epilepsy and pain. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 457–469. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.14.4.457>.
- Wickenden, A.D., Yu, W., Zou, A., Jegla, T., Wagoner, P.K., 2000. Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 58, 591–600. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.58.3.591>.
- Wickenden, A.D., Zou, A., Wagoner, P.K., Jegla, T., 2001. Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br. J. Pharmacol.* 132, 381–384. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703861>.
- Wuttke, T.V., Seebohm, G., Bail, S., Maljevic, S., Lerche, H., 2005. The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol. Pharmacol.* 67, 1009–1017. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.010793>.
- Yang, W.P., Levesque, P.C., Little, W.A., Conder, M.L., Ramakrishnan, P., Neubauer, M.G., Blannar, M.A., 1998. Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J. Biol. Chem.* 273, 19419–19423.
- Yeung, S.Y., Lange, W., Schwake, M., Greenwood, I.A., 2008. Expression profile and characterisation of a truncated KCNQ5 splice variant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 741–746. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.129>.
- Yu, H., Wu, M., Townsend, S.D., Zou, B., Long, S., Daniels, J.S., McManus, O.B., Li, M., Lindsley, C.W., Hopkins, C.R., 2011. Discovery, synthesis, and structure activity relationship of a series of N-aryl- bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamides: characterization of ML213 as a novel KCNQ2 and KCNQ4 potassium channel opener. *ACS Chem. Neurosci.* 2, 572–577. <http://dx.doi.org/10.1021/cn200065b>.

Figure 1-SUPPLEMENTARY

A



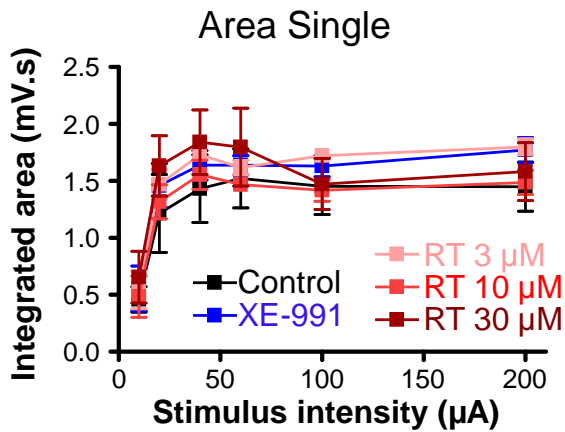
B



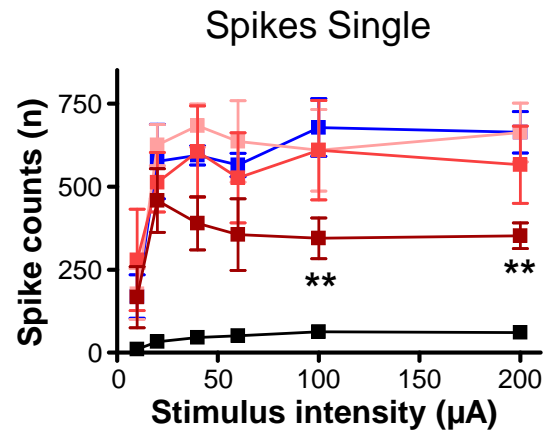
Supplementary figure 1. Concentration-response curves for the effects of Kv7 modulators on responses to single stimulation of the dorsal root. Curves show reduction in area of cumulative depolarisation (A) and total spike counts (B) obtained in response to high intensity electrical stimulation (200 μ s; 200 μ A). For integrated area EC50 values (log EC50 \pm SEM) were 3.8 μ M (-5.42 \pm 0.14) for retigabine, 3.4 μ M (-5.47 \pm 0.15) for ICA-069673 and 0.4 μ M (-6.43 \pm 0.14) for ML213. The corresponding values for spike counts were 3.1 μ M (-5.51 \pm 0.28) for retigabine, 5.8 μ M (-5.24 \pm 0.32) for ICA-069673 and 0.9 μ M (and -6.06 \pm 0.18) for ML213.

Figure 2-SUPPLEMENTARY

A

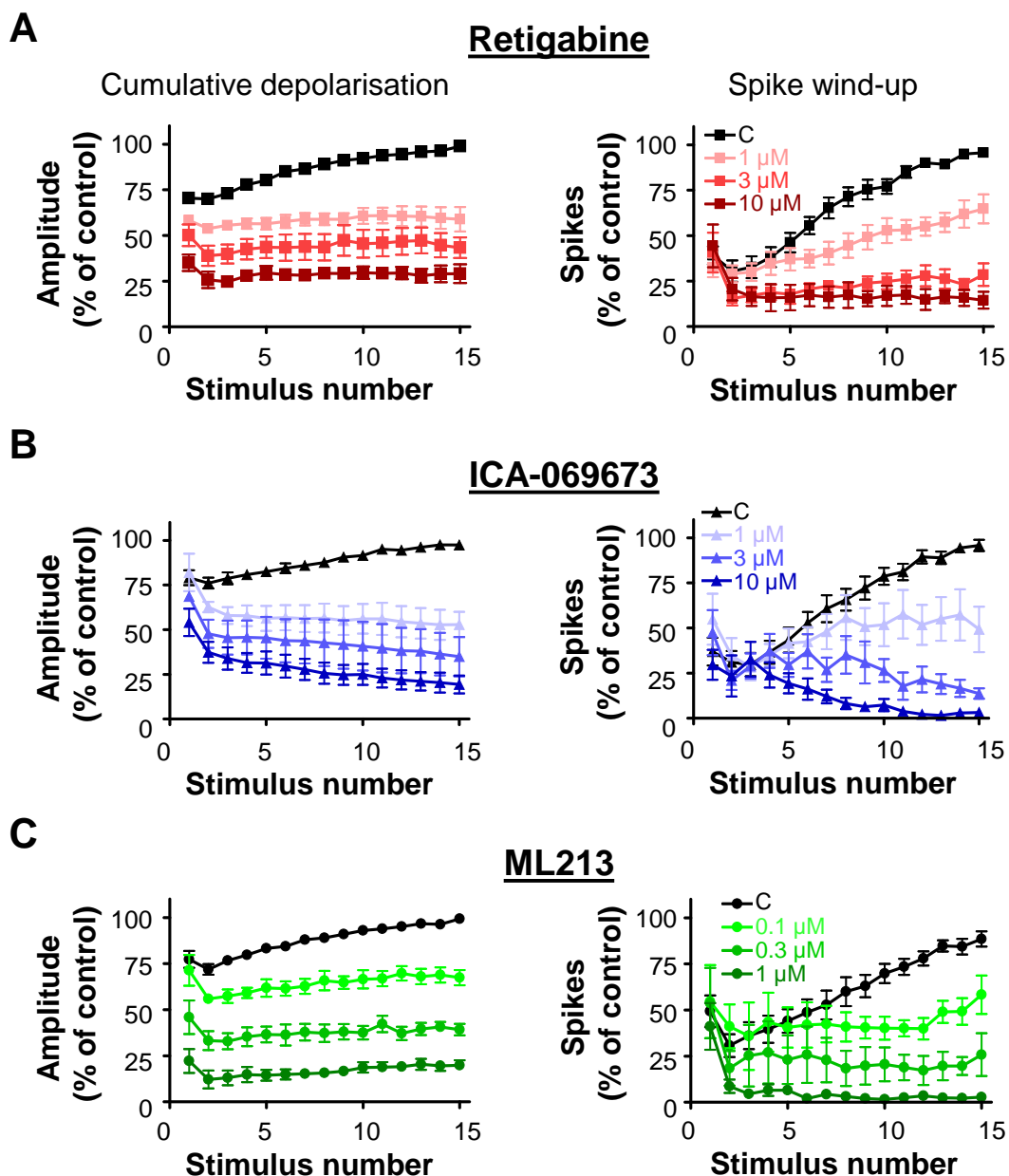


B



Supplementary figure 2. Retigabine retains certain depressant action on ventral root responses to single stimulation after Kv7 channel blockade with XE-991. Graphs shows a quantification of the responses to single dorsal root stimulation as obtained from 4 experiments in control, after blockade of Kv7 channels with 10 µM XE-991 and with the subsequent application of retigabine at 3, 10 and 30 µM. Application of XE-991 increased the integrated area (**A**) and spike counts (**B**). Coapplication of retigabine with XE-991 produced a significant reduction in spike counts only at 30 µM (Two-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test, **p < 0.01).

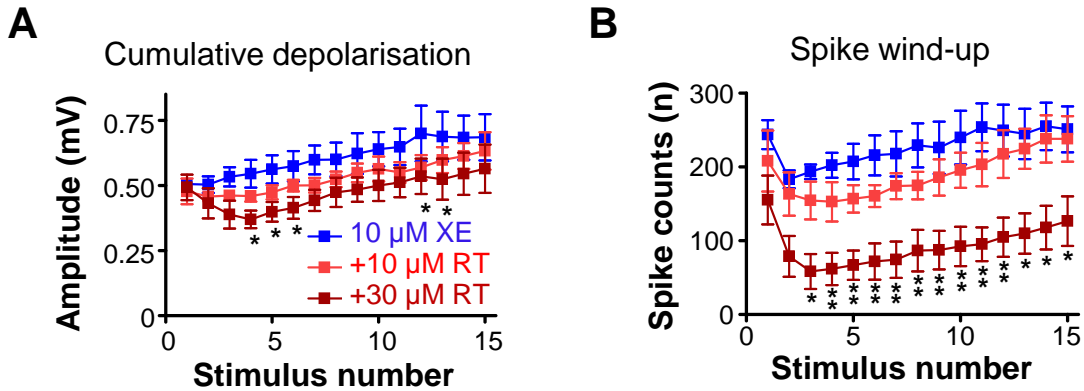
Figure 3-SUPPLEMENTARY



Supplementary figure 3. Activation of Kv7 channels abolished cumulative depolarisation and spike wind up

Graphs show a quantification of the amplitude (left) and spikes counts (right) as obtained for each successive stimulus of the train. Data were normalised to the maximum value obtained in control for each experiment. Retigabine (1-10 μM , $n = 5-6$; **A**), ICA-069673 (1-10 μM , $n = 3-5$; **B**) and ML213 (0.1-1 μM , $n = 5$; **C**) produced a concentration-dependent reduction in both cumulative depolarisation and spike wind up that was statistical significant for all curves shown (Two-Way ANOVA). Note that all compounds were able to abolish the progressive summation of the responses.

Figure 4-SUPPLEMENTARY



Supplementary figure 4. Nonspecific effects of retigabine on responses to dorsal root repetitive stimulation at high intensity.

In the presence of 10 μ M XE-991, retigabine (30 μ M) still produced a reduction of the cumulative depolarisation (**A**) and a strong effect on spike wind up (**B**). Note that summation was not abolished contrary to the effect observed by retigabine alone (see table 1 and supplementary figure 2). Asterisks stand for statistically significant differences from XE-991 values as obtained with Two-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test ($n = 4$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Capítulo 2

Implication of K_v7 Channels in the Spinal
Antinociceptive Actions of Celecoxib



Implication of K_v7 Channels in the Spinal Antinociceptive Actions of Celecoxib

Jorge Vicente-Baz, Jose A. Lopez-Garcia, and Ivan Rivera-Arconada

Department of Systems Biology (Physiology), Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received March 11, 2019; accepted June 18, 2019

ABSTRACT

Celecoxib is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) commonly used to treat pain conditions in humans. In addition to its blocking activity on cyclooxygenase (COX) enzymes, several other targets could contribute to its analgesic activity. Here we explore the spinal antinociceptive actions of celecoxib and the potential implication of K_v7 channels in mediating its effects. Spinal cord *in vitro* preparations from hind paw-inflamed animals were used to assess the segmental sensory-motor and the early sensory processing of nociceptive information. Electrophysiological recordings of ventral roots and dorsal horn neurones were obtained, and the effects of celecoxib and K_v7 modulators on responses to repetitive dorsal root stimulation at C-fiber intensity were assessed. Celecoxib applied at clinically relevant concentrations produced depressant effects on responses to

dorsal root stimulation recorded from both ventral roots and individual dorsal horn neurones; by contrast, the non-nociceptive monosynaptic reflex was unaffected. The NSAID indomethacin had no effect on spinal reflexes, but further coapplication of celecoxib still produced depressant effects. The depressant actions of celecoxib were abolished after K_v7 channel blockade and mimicked by its structural analog dimethyl-celecoxib, which lacks COX-blocking activity. The present results identify K_v7 channels as novel central targets for celecoxib, which may be relevant to its analgesic effect. This finding contributes to better understand the pharmacology of celecoxib and reinforces both the role of K_v7 channels in modulating the excitability of central pain pathways and its validity as target for the design of analgesics.

Introduction

Celecoxib, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with selective activity on cyclooxygenase 2 (COX-2) isozymes, is used for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis in humans (Clemett and Goa, 2000). Celecoxib applied systemically is effective in reducing nociceptive behaviors in various animal models of pain, including the formalin test and the carrageenan model of paw inflammation (Penning et al., 1997; Zhang et al., 1997; Smith et al., 1998; Inoue et al., 2009; Sun et al., 2013). In addition, the application of celecoxib and other NSAIDs by the intrathecal route also produces antinociceptive effects in the same models (Malmberg and Yaksh, 1992; Dirig et al., 1998; Nishiyama, 2006; Lee and Seo, 2008). These reports suggest that, in addition to peripheral actions, the spinal cord may be a relevant site for NSAID-induced analgesia. In addition to its COX-blocking actions, celecoxib has been reported to interact with opioid and cannabinoid systems as well as a variety of ionic channels (Park et al., 2007; Brueggemann et al., 2009; Du et al., 2011; Rezende et al., 2012; Frolov and Singh, 2014).

Of special interest for nociceptive processing, celecoxib affects the activity of voltage-dependent potassium channels of the K_v7 family (Du et al., 2011). These channels are expressed in peripheral and central elements of the nociceptive system (Rivera-Arconada et al., 2009), and their modulation alters the excitability of primary afferents and spinal neurones due to its fundamental role regulating membrane resting potential and repetitive firing (Jentsch, 2000; Passmore et al., 2003; Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005). The K_v7 channel opener retigabine when applied systemically shows analgesic-like effects on animal models of inflammatory, visceral, neuropathic, and cancer pain (Blackburn-Munro and Jensen, 2003; Passmore et al., 2003; Hirano et al., 2007; Zheng et al., 2013). Application of celecoxib to dorsal root ganglion neurones *in vitro* produces an enhancement of K_v7 -mediated currents, an effect that may be relevant to its analgesic actions (Mi et al., 2013).

Here we explore the potential contribution of K_v7 channels, as expressed in spinal neurones, to the analgesic effects of celecoxib. To this end, we used electrophysiologic recordings of spinal reflexes and dorsal horn neurones in an *in vitro* preparation of the mouse spinal cord obtained after the induction of inflammation. The effect of celecoxib on spinal function was assessed and the contribution of K_v7 channels was tested using a variety of pharmacologic tools. Our results are

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant No. SAF2016-77585-R) and the University of Alcalá (Grant No. CCG2018/BIO-028). J.V.-B. has received a fellowship from the University of Alcalá.

<https://doi.org/10.1124/jpet.119.258053>

ABBREVIATIONS: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; COX, cyclooxygenase; Dil, (2Z)-2-[(E)-3-(3,3-dimethyl-1-octadecylindol-1-ium-2-yl)prop-2-enylidene]-3,3-dimethyl-1-octadecylindole; perchlorate; DMC, 2,5-dimethyl-celecoxib; ICA-069673, *N*-(2-chloro-5-pyrimidinyl)-3,4-difluorobenzamide; MEA, multielectrode array; ML 213, *N*-(2,4,6-trimethylphenyl)-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide; MSR, monosynaptic reflex; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; XE-991, 10,10-bis(pyridin-4-ylmethyl)anthracen-9-one.

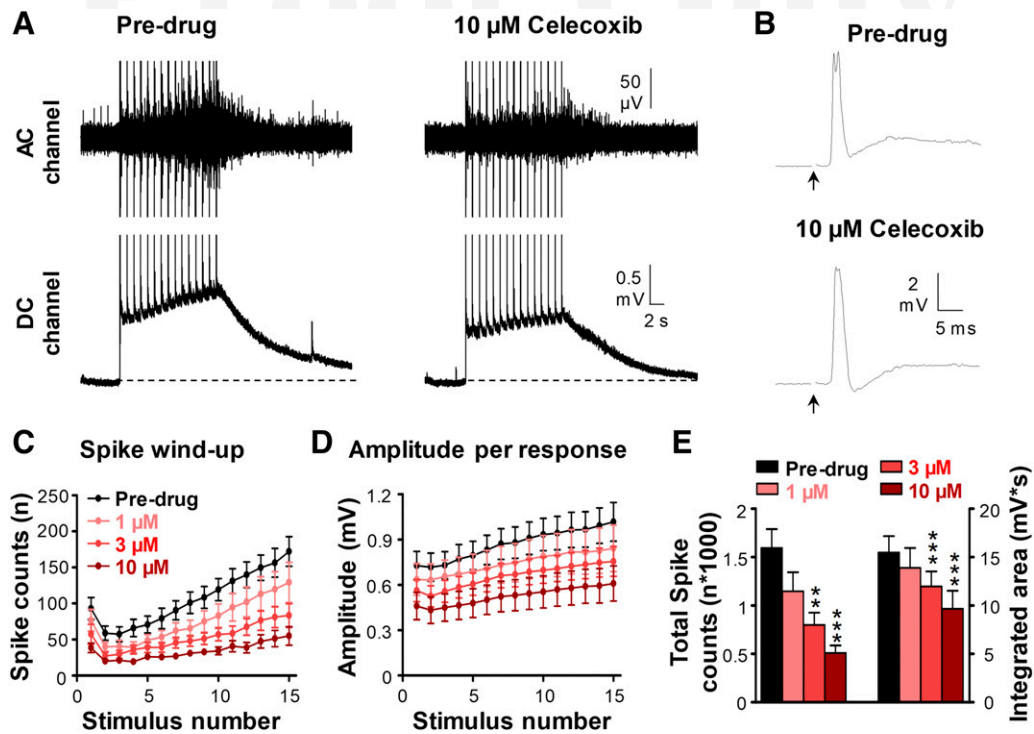


Fig. 1. Actions of celecoxib on ventral root reflexes. This figure summarizes celecoxib's effects on ventral root responses elicited by repetitive stimulation of the dorsal root at C-fiber intensity as obtained in spinal cords from inflamed mice. (A) Original recordings showing the responses in control conditions (left) and after application of 10 μM celecoxib (right). In control conditions, repetitive stimulation (large vertical lines) originates a cumulative depolarization in the DC channel associated with spike wind-up in the AC channel (gradual thickening of baseline). Note the depressant effects of celecoxib on both parameters. (B) Original recordings showing the MSR before and after application of celecoxib. Note the lack of effect of celecoxib on MSR amplitude. Arrows indicate the stimulus artifacts, which have been eliminated to improve visualization. In A and B, three increasing concentrations were tested but only the maximal concentration used is shown. (C and D) A quantification of spike counts (C) and amplitude (D) as obtained for each successive stimulus of the train ($n = 10$). Celecoxib produced a concentration-dependent reduction in spike wind-up and cumulative depolarization. (E) Graph summarizing the effects of the three concentrations of celecoxib tested on the total spike counts ($F[3,27] = 16.02$; $P < 0.001$; one-way ANOVA) and the integrated area of the cumulative depolarization ($F[3,27] = 18.45$; $P < 0.001$; one-way ANOVA). Asterisks indicate significant differences from predrug values using Bonferroni post hoc test (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

in agreement with the hypothesis that modulation of K_v7 channels is relevant to the spinal antinociceptive actions of celecoxib.

Materials and Methods

All experimental protocols were performed following the European Union and Spanish Government regulations for animal handling, were approved by the local ethics committee and the Government of the Community of Madrid (Ref. PROEX 018/16) and comply with the ARRIVE guidelines. Experiments were performed on 6- to 11-day-old CD1 mice of either sex weighing between 4 and 9.7 g. The animals were bred in house, kept together with their mothers, and were maintained under a 12-hour light/dark cycle with $55\% \pm 15\%$ humidity. The number of animals used was kept to the minimum that allowed a clear interpretation of main results. All efforts were made to minimize animal suffering.

Induction of Peripheral Inflammation and Behavioral Testing. Peripheral inflammation was induced by intraplantar injection of carrageenan (3% in saline; 30 μl) in both hind paws. This procedure ensured maximum inflammation and allowed the use of either side of the cord in electrophysiologic experiments. Paw diameters and mechanical withdrawal thresholds were measured before and 20 hours after carrageenan injection. The withdrawal threshold was defined as the minimum mechanical force applied with von Frey filaments (from 0.008 to 2 g) that elicited a withdrawal response in at least three out of five trials. For statistical analyses, the threshold and paw diameter of the hind paw

ipsilateral to the hemi cord used for electrophysiologic recordings were considered.

In Vitro Spinal Cord Preparations and Dorsal Root Stimulation. Mice were anesthetized with urethane (2 mg kg^{-1} , i.p.), and their spinal cords were extracted after a dorsal laminectomy following a procedure described in full elsewhere (Lopez-Garcia and Laird, 1998). The whole cord was used for recording spinal reflexes. The spinal cord was hemisected to make multielectrode recordings from deep dorsal horn neurones. To record neurones located in superficial laminae, the lumbar enlargement of the whole spinal cord was sliced in a vibratome to obtain a single slice of $\approx 400 \mu\text{m}$ containing the dorsal part of the cord (laminae from I to V) together with the attached dorsal roots.

In the recording chamber, the cord was pinned down to the Sylgard base of the chamber with the medial or sectioned side upward to facilitate electrode penetration. Cords were continuously superfused (4–6 ml min^{-1}) with oxygenated (95% O_2 ; 5% CO_2) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) at room temperature ($22 \pm 1^\circ \text{C}$). The composition of the aCSF was (in millimolars): NaCl (127), KCl (1.9), KH_2PO_4 (1.5), MgSO_4 (1.3), CaCl_2 (2), NaHCO_3 (22), and glucose (10); pH 7.4.

Electrical stimuli were applied to the L4 dorsal root via tight-fitting glass suction electrodes. Electrical stimulation consisted of a train of 15 consecutive C-fiber intensity stimuli (200 μA , 200 microseconds) applied at 1 Hz to produce wind-up responses. Trains of stimuli were applied at 30-minute intervals.

Ventral Root Reflex Recordings. The L4 ventral root was placed in a tight-fitting glass suction electrode. Signals were obtained using a Multiclamp 7A amplifier (Molecular Devices,

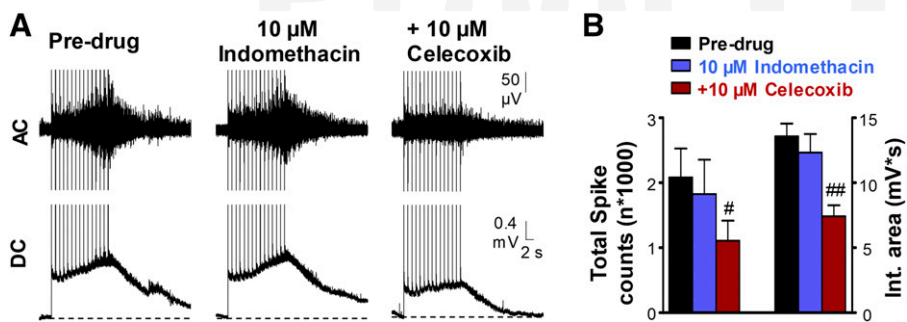


Fig. 2. Celecoxib still depressed spinal reflexes after indomethacin application. (A) Original recordings showing the lack of effect of indomethacin ($P = 0.16$ for cumulative depolarization, and $P = 0.33$ for spike wind-up; paired t test) and the subsequent actions of celecoxib. In the presence of indomethacin, celecoxib still produces a profound depression of nociceptive reflexes ($P = 0.01$; $P = 0.04$ for cumulative depolarization and spike wind-up, respectively; paired t test). (B) Graph summarizing the results obtained in the six experiments made. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ stand for statistically significant differences between indomethacin and celecoxib values as obtained with paired t test.

Sunnyvale, CA), were sampled at 6 kHz, and were stored for analysis using Spike 2 software (CED, Cambridge, United Kingdom). Depolarization of motoneuronal populations was recorded in DC channel.

Repetitive dorsal root stimulation at C-fiber intensity produced a cumulative depolarization. For each of the 15 stimuli, the amplitude from baseline was measured at the end of the response. The integrated area under the curve during the 24 seconds after the first stimulus artifact was measured to quantify the cumulative depolarization. Electrical stimuli elicited a monosynaptic reflex (MSR) at 5–10 milliseconds from stimulus artifact. The MSR was quantified as amplitude from baseline using the first stimulus of the train.

Digital band-pass filtering of the original DC signal between 200 and 1200 kHz allowed us to generate an AC channel to collect fast spike-like events produced by the firing of action potentials in motor neurones (Rivera-Arconada et al., 2016). Events crossing an amplitude threshold were counted in a time window between 100 and 950 milliseconds from stimulus artifact and summed to obtain the total spike counts to each train of stimuli. Stable baseline responses were usually obtained after two to four repetitions.

Multielectrode Recordings from Dorsal Horn Neurones and Estimation of Recording Sites. Multielectrode arrays (MEAs; A4 × 4 3 mm-50/100-125–177-A16 or Buzsaki32; NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) had four shanks with four to eight iridium recording sites separated by 30–100 μm. The MEA tips were placed under visual guidance and were introduced using a remote-controlled micromanipulator. For recordings of deep dorsal horn neurones, extracellular signals were preamplified ×10 (MPA81; Multichannel Systems, Reutlingen, Germany) and were further amplified ×500 with an 8-channel amplifier (Cyberamp; Molecular Devices) (Roza et al., 2016). In recordings from superficial dorsal horn neurones, the electrode was connected to a RHS2000 32-channel headstage containing two RHS2116 amplifier chips (Intan Technologies, Los Angeles, CA) (Lucas-Romero et al., 2018). The signals were band-pass filtered between 200–300 Hz and 3 kHz, digitized at 20 kHz (1401 Plus; CED), and stored for analysis.

Spike sorting was performed offline based on spike-shape parameters using Spike 2. Only data obtained from unequivocally classified units were considered as single unit activity. One to five neurones were isolated from each experiment. Action potentials elicited by dorsal root stimulation were counted excluding the 50 milliseconds after stimulus artifact. Drugs were applied only if responses to repetitive stimuli were stable during two or three stimulation cycles. Responses of dorsal horn neurones recorded with MEAs were reproducible during long-lasting (1.5-hour) applications of the solvent DMSO (12 neurones from three different preparations).

To estimate the position of the deep dorsal horn neurones recorded, the electrode position inside the cord was estimated by DiI labeling [(2Z)-2-[(E)-3-(3,3-dimethyl-1-octadecylindol-1-ium-2-yl)prop-2-enylidene]-3,3-dimethyl-1-octadecylindole; perchlorate (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain)]. At the end of a successful track, a microelectrode with identical characteristics stained with DiI was placed in the micromanipulator and lowered to the recording position. This electrode substitution was performed to avoid unnecessary exposure of neurones to

DiI and to prevent damage to the recording electrode. Then the spinal cord was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, embedded in gelatin, and sectioned in a cryostat at 100 μm.

DiI fluorescence was visualized directly onto sectioned tissue, and the depth and trajectory of the electrode were recovered (Roza et al., 2016). After the recording session, the slice was fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in gelatin, and sectioned in a cryostat at 30 μm. Then sections were stained with toluidine 0.1% and dehydrated to obtain an estimation of the laminae contained in the slice. In recordings from superficial dorsal horn neurones, the distance of the electrode tip to the dorsal border of the spinal cord was measured with the micromanipulator.

Drugs and Chemicals. Carrageenan lambda, celecoxib, 10,10-bis(pyridin-4-ylmethyl)anthracen-9-one (XE-991), indomethacin, 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC), and the components for the aCSF were purchased from Sigma-Aldrich. Linopirdine was acquired from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). The aCSF was freshly prepared for each experiment. The compounds were prepared in DMSO as concentrated stock solutions (10–20 mM) and stored at -20°C . All compounds were diluted down to the final concentration in aCSF just before use and were superfused to the entire preparation for at least 25-minute periods to ensure a complete tissue equilibration.

To study the effect of the compounds, each preparation received applications of only one of the compounds at a maximum of three increasing concentrations. In experiments designed to assess the implication of COX enzymes, 10 μM indomethacin was applied during 60 minutes and then 10 μM celecoxib was added to the perfusion medium. In other series of experiments, the $K_{v}7$ channel blockers XE-991 or linopirdine were superfused for 60–90 minutes before the application of celecoxib or DMC.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). All data are presented as mean ± S.E.M. unless otherwise stated. Analyses of data from behavioral assays were made using Wilcoxon matched pairs test. The effects of celecoxib on spinal reflexes were first compared with control experiments with DMSO applications using the same three concentrations schedule to avoid a misinterpretation of drug actions due to the long-lasting protocol employed. These comparisons were done using a two-way ANOVA test with data normalized to predrug (or presolvent) values. Concentration-dependent effects of the drugs from predrug values were analyzed in raw data using Bonferroni post hoc test after repeated measures one-way ANOVA. For electrophysiologic studies with a single concentration of drug, the comparisons to predrug values were performed using paired t test analysis.

Results

Celecoxib Actions on Spinal Reflexes Recorded from Paw-Inflamed Mice. Intraplantar injections of carrageenan induced an inflammatory process in mice pups characterized by paw swelling and allodynia. Twenty hours after carrageenan injection, paw diameter increased from 2.18 ± 0.02 to

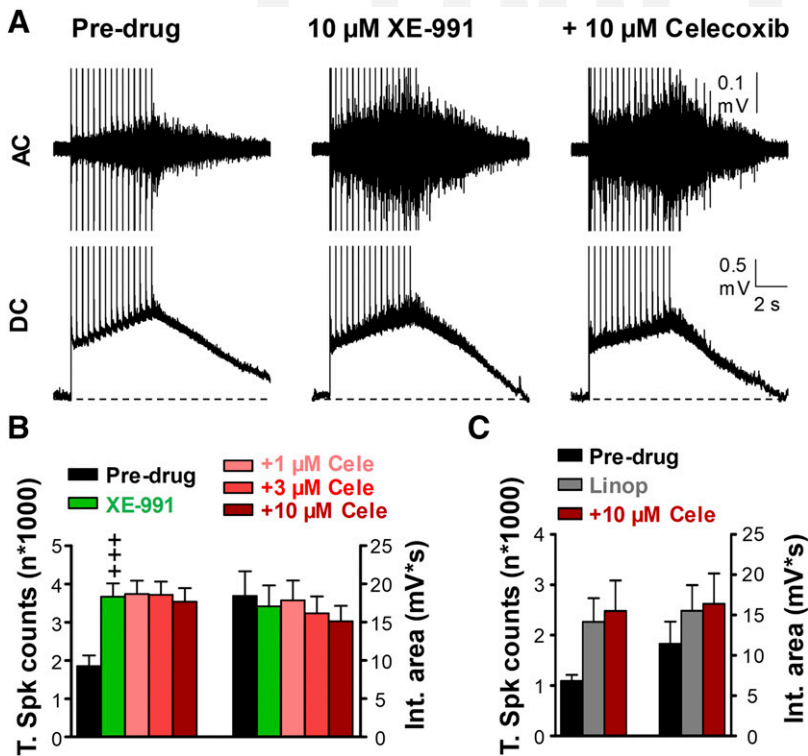


Fig. 3. Implication of K_v7 channel modulation in the effects of celecoxib. (A) Original recordings showing the lack of effect of celecoxib after K_v7 channel blockade with 10 μM XE-991. XE-991 applied during 90 minutes produced an increase in spike firing; then celecoxib (Cele), coapplied at three increasing concentrations, was devoid of effect. (B) Graph summarizing results obtained in seven experiments. XE-991 increased firing ($P < 0.001$; paired t test) with no effect on the integrated area of the cumulative depolarization ($P = 0.082$; paired t test). In the presence of XE-991 no effects of celecoxib were observed ($F[3,18] = 2.0$; $P = 0.15$, for cumulative depolarization and $F[3,18] = 0.3$; $P = 0.8$, for spike wind-up; one-way ANOVA). (C) Graph showing the results obtained in the four experiments in which celecoxib (10 μM) was applied after K_v7 channel blockade with linopirdine (Linop; 10 μM). Linopirdine on its own did not produce significant changes on spinal reflexes ($P = 0.069$ for cumulative depolarization and $P = 0.075$ for spike wind-up; paired t test). No depressant effects of celecoxib were observed either in cumulative depolarization ($P = 0.47$; paired t test) or spike wind-up ($P = 0.81$; paired t test). +++ Significant differences ($P < 0.001$) between predrug and XE-991 values.

2.68 ± 0.06 mm ($P < 0.001$; Wilcoxon test, $n = 58$), and mechanical withdrawal thresholds assayed with von Frey filaments were reduced from a median force of 1g to a median force of 0.04 g ($P < 0.001$; Wilcoxon test, $n = 58$).

After spinal cord extraction, spinal reflexes elicited by dorsal root stimulation were recorded from the ventral root. Repetitive dorsal root stimulation at C-fiber intensity induced a progressive potentiation of the responses recorded from the ventral root that manifested as a cumulative depolarization associated with spike wind-up (Fig. 1A). Integrated area of cumulative depolarization and spike wind-up were analyzed to assess the drug effects on nociceptive transmission. The effects of celecoxib at three different concentrations (1, 3, and 10 μM; $n = 10$) were compared with those of the solvent DMSO applied with the same protocol in a separate series of experiments ($n = 5$). A two-way analysis of variance detected significant depressions produced by celecoxib on the cumulative depolarization ($F[1,13] = 13.34$; $P = 0.003$) and the associated spike wind-up ($F[1,13] = 8.53$; $P = 0.012$). The effects of celecoxib were concentration-dependent, and compared with predrug values, the effects on both cumulative depolarization and spike wind-up were statistically significant at concentrations ≥ 3 μM (Fig. 1, C–E).

Dorsal root stimulation caused, in addition, the activation of thick myelinated fibers of muscle origin producing an MSR recorded from the ventral root as a short latency peak (Fig. 1B). Celecoxib did not have significant effects on the MSR ($F[1,10] = 0.86$, $P = 0.38$).

To evaluate the contribution of COX block on celecoxib's actions, we used the irreversible COX blocker indomethacin (Rome and Lands, 1975). To this end, indomethacin was applied at 10 μM during 1 hour, and then 10 μM celecoxib was coapplied during 30 minutes. Indomethacin alone showed no significant effects in cumulative depolarization or spike

wind-up (Fig. 2). However, further application of celecoxib produced a significant depression of both parameters compared with values obtained under indomethacin (Fig. 2).

Implication of K_v7 Channels in the Actions of Celecoxib on Spinal Reflexes. The previous results suggest that depressant effects of celecoxib on spinal nociceptive reflexes are mediated by a COX-independent mechanism. To test the possible contribution of K_v7 channels, we studied the effect of K_v7 channel blockade on the depressant action of celecoxib. Superfusion of the K_v7 channel blocker XE-991 at 10 μM on its own produced a strong increase in spike wind-up, but not on the underlying cumulative depolarization ($n = 7$; Fig. 3, A and B). The depressant effects of celecoxib were fully abolished after K_v7 blockade with XE-991 (Fig. 3, A and B). Similar results were obtained using linopirdine, another blocker of K_v7 channels ($n = 4$; Fig. 3C).

To further confirm the implication of K_v7 channels on celecoxib effects, we superfused the cord with DMC, an analog of celecoxib devoid of activity on COX enzymes. DMC applied at 10 μM strongly depressed nociceptive transmission ($n = 5$, Fig. 4, A and B). As observed with celecoxib, previous block of K_v7 channels prevented all depressant actions of DMC ($n = 3$, Fig. 4C).

Effects of Celecoxib on the Responses of Dorsal Horn Neurones. A first series of experiments was conducted to address the potential effects of celecoxib on the spinal sensory neurones that contribute to the initial steps of sensorimotor processing. Extracellular recordings with MEAs were obtained from deep dorsal horn neurones using a hemisected spinal cord preparation that allowed us to gain access directly to the gray matter. Twenty-four neurones were successfully isolated from 18 hemisected cords. Recording sites recovered after DiI labeling, and histologic processing showed that electrode tracks were located in lamina IV to VI, between 223 and 436 μm from the medial side (Fig. 5A).

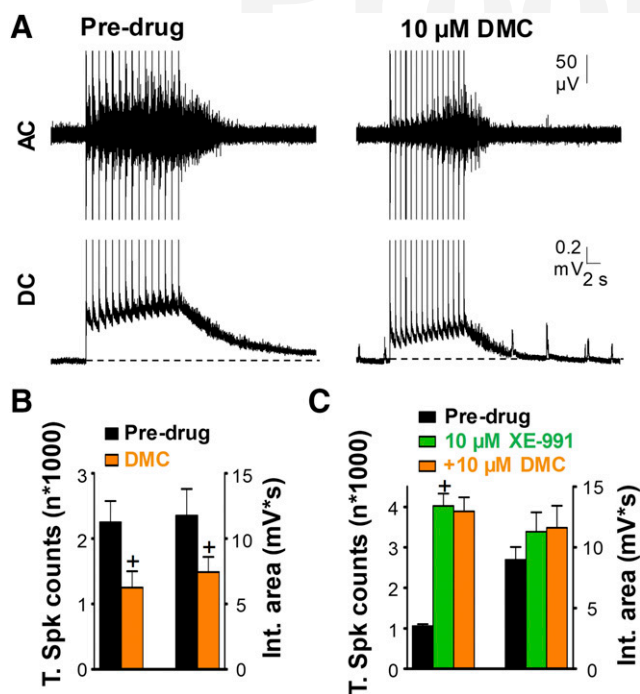


Fig. 4. Actions of the structural analog DMC on nociceptive reflexes. (A) Recordings illustrate the effects of 10 μM DMC on cumulative depolarization ($P = 0.014$; paired t test) and spike wind-up ($P = 0.034$; paired t test), showing the same pattern of action than celecoxib. (B) Pooled data from five experiments. (C) Graph summarizing the results obtained in the three experiments that received DMC after K_v7 channels blockade with XE-991. XE-991 application increased spike wind-up ($P = 0.014$; paired t test) and showed no effect on cumulative depolarization ($P = 0.15$; paired t test). Further application of DMC was devoid of effect. \dagger Statistically significant differences ($P < 0.05$) from predrug values as obtained using paired t test.

Celecoxib was applied at 3 and 10 μM to 13 neurones. Repetitive dorsal root stimulation elicited wind-up responses in three neurones, whereas another eight neurones were able to maintain spike firing during the train of stimuli and the remaining two neurones showed a spike wind-down. In nine of them, action potential firing in response to C-fiber stimulation was depressed by $\geq 20\%$ (Fig. 5, B and D). Pooling together data from all neurones we obtained statistically significant differences at both concentrations. The four neurones insensitive to celecoxib showed a pattern of maintained firing in response to repetitive dorsal root stimulation.

Occlusion experiments with XE-991 were performed to explore the involvement of K_v7 channels in the effects of celecoxib. Responses to repetitive stimulation in predrug conditions for the five neurones tested included wind-up responses (two), neurones maintaining spike firing (two), and one neurone showing spike wind-down. A 60-minute application of XE-991 at 10 μM produced a mild but significant change in neuronal responses to repetitive stimuli ($n = 5$). After the superfusion of XE-991, applications of celecoxib at 3 and 10 μM were completely devoid of effects in the five neurones tested (Fig. 5, C and E).

In an additional set of experiments, we wanted to explore the effects of celecoxib on neurones more specifically related to nociceptive processing. Using a slice containing the laminae from I to V of the dorsal horn, we obtained MEAs recordings of the activity of superficial dorsal horn neurones in response to repetitive dorsal root stimulation at C-fiber intensity. Twenty-one

superficial dorsal horn neurones were isolated from eight spinal cord slices. Electrode tips were situated at 20–60 μm from the dorsal border of the spinal cord, allowing all the sensors to be located within laminae I–III (see Fig. 6A).

Celecoxib applied at 10 μM depressed the responses to dorsal root stimulation in 10 out of 12 neurones tested (Fig. 6, B and D). Neurones inhibited by celecoxib showed wind-up (two), wind-down (three), or maintained (five) responses to repetitive stimulation. Two more neurones insensitive to celecoxib had wind-up responses.

Occlusion experiments with XE-991 were made in nine additional neurones showing wind-up (five), wind-down (two), or maintained firing (two). XE-991, applied at 10 μM during 60 minutes, produced slightly increased responses in seven neurones, but this trend did not reach statistical significance. The posterior coapplication of 10 μM celecoxib was devoid of effects in the nine neurones tested (Fig. 6, C and E).

Discussion

Applications of celecoxib to the in vitro mouse spinal cord produced a concentration-dependent depression of nociceptive reflexes, manifested as a reduction of action potential wind-up and the underlying cumulative depolarization, a model widely used to study nociceptive processing in the spinal cord (Herrero et al., 2000). On the other hand, the monosynaptic reflex, a purely non-nociceptive response, was unaffected by celecoxib. This profile of action on spinal reflexes is very similar to that of other analgesics, including morphine (Mazo et al., 2015). In addition, celecoxib reduced the firing of dorsal horn neurones in response to C-fiber stimulation, indicating a specific action of the compound on sensory neurones. These results are in line with previous reports showing that celecoxib applied by intrathecal route reduces nociceptive behaviors evoked by formalin injection in the hind paws (Nishiyama, 2006; Lee and Seo, 2008).

The present results show significant depressant effects of celecoxib at concentrations $\geq 3 \mu\text{M}$. These are in range with plasmatic levels of celecoxib achieved in humans after treatment (100–400 mg, 1–4 μM) (Davies et al., 2000), which suggests that the spinal actions of celecoxib may be relevant to its analgesic effects under clinical conditions.

In this work, carrageenan-inflamed mice were used in an attempt to maximize COX activity. Both COX isozymes are constitutively present in the spinal cord, and their expression appears to up-regulate under neuropathic and inflammatory processes (Hay and de Belleruche, 1997; Zhu and Eisenach, 2003). However, some reports suggest that spinal COX activity is not relevant to acute pain transmission nor to the maintenance of hyperalgesia in inflammatory models (Yamamoto and Nozaki-Taguchi, 1996; Dirig et al., 1998; Vardeh et al., 2009). This view is reinforced by the lack of effect of indomethacin on spinal reflexes and the large, likely unspecific concentrations of other NSAIDs required to cause depression (Lopez-Garcia and Laird, 1998; Lizarraga et al., 2006).

Our carrageenan-inflamed mice showed signs of edema and allodynia. Previous reports using this in vitro model have shown larger spinal reflexes in treated rats than in controls (Hedo et al., 1999). In our study, the application of indomethacin at 10 μM , a concentration above its therapeutic range and IC_{50} values for COX inhibition (Kurumbail et al., 1996;

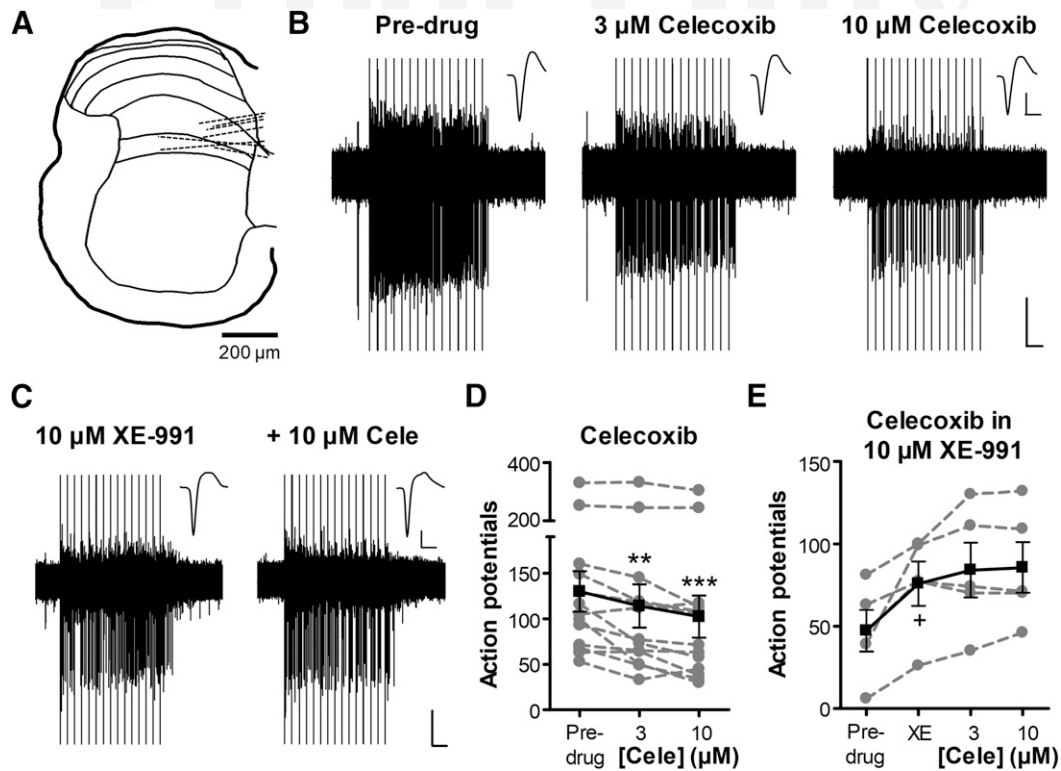


Fig. 5. Effects of celecoxib on the activity of deep dorsal horn neurones. (A) Drawing of a transverse section of the hemisected spinal cord (dorsal side up) with a reconstruction of its borders and laminar organization. The approximate location of the multielectrode shanks used for recording were recovered after DiI labeling. Dotted lines indicate the trajectory of the electrodes inside the spinal cord from the seven experiments in which labeling with DiI was obtained. (B) Original recordings showing celecoxib (3 and 10 μM) effects on action potential firing in response to repetitive high-intensity stimulation of the dorsal root as obtained from a deep dorsal horn neurone. (C) Illustration of the lack of effect of celecoxib after K_v7 channel blockade with XE-991. Celecoxib at 3 and 10 μM was coapplied with 10 μM XE-991, but only the higher concentration is shown. Insets show the average of all action potentials in each condition. Calibration bars for all recordings: 0.2 mV and 2 seconds (0.2 mV and 1 millisecond for insets). (D) Graph showing the effects of celecoxib on action potential firing in response to repetitive dorsal root stimulation in the 13 neurones tested. Celecoxib had depressant effects on neuronal firing ($F[2,24] = 15.28$; $P < 0.001$; one-way ANOVA). The vertical axis was broken to improve visualization. (E) Graph summarizing the effects of celecoxib at 3 and 10 μM after K_v7 channel blockade with XE-991 in the five neurones tested. XE-991 increased the firing of deep dorsal horn neurones ($P = 0.026$; paired t test). In the presence of XE-991, the coapplication of celecoxib was devoid of effect ($F[2,8] = 1.58$; $P = 0.26$; one-way ANOVA). For both graphs, the values for individual neurones are shown in gray; mean \pm S.E.M. values for all neurones included in the graph are indicated in black. Asterisks (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$) and plus signs (+ $P < 0.05$) indicate statistically significant differences from predrug values as obtained using the Bonferroni post hoc test after one-way ANOVA or paired t test, respectively.

Kalgutkar et al., 2000; Lucas, 2016), was devoid of effect on spinal reflexes, whereas subsequent coapplication of celecoxib produced clear depressant actions. These observations suggest a minor role for COX blockade in the actions of celecoxib on spinal transmission and a likely contribution of other unspecific targets for this compound.

Celecoxib applied at concentrations similar to those used in the present experiments has been shown to exert direct actions on heterologous expressed K_v7 channels and on native M-currents expressed in dorsal root ganglia neurones (Brueggemann et al., 2009; Du et al., 2011; Mi et al., 2013). A recent report has shown that K_v7 subunits 2, 3, and 5 are present in the spinal cord and are expressed in both inhibitory and excitatory dorsal horn neurones (Haring et al., 2018). Interestingly, they found that the $K_v7.5$ subunit is expressed in two populations of glutamatergic neurones (glut 11 and 12), which became activated by noxious thermal stimulation. In this line, other work employing a similar approach (Sathya-murthy et al., 2018) also reported the expression of $K_v7.5$ subunits in a population of excitatory neurones (DE-7) that express the Fos gene after formalin application.

Celecoxib can interact with several homo- and heteromeric conformations of K_v7 channels showing EC_{50} values between

2 and 5 μM . Celecoxib shifts the activation curve of K_v7 -mediated currents to the left and produces an approximately 2-fold increase in conductance (Du et al., 2011). In previous studies, we showed that retigabine, the standard K_v7 channel opener, has depressant actions on spinal reflexes comparable to those obtained here for celecoxib (Rivera-Arconada et al., 2004; Vicente-Baz et al., 2016). Like celecoxib, retigabine has similar affinity for different K_v7 channel subunits and EC_{50} values in the low micromolar range (Tatulian et al., 2001; Wickenden et al., 2001).

The major proof obtained here in favor of the implication of K_v7 channels in mediating the spinal effects of celecoxib comes from the experiments with K_v7 channel blockers. Under the present conditions, XE-991 showed clear potentiating actions on the firing of motor neurones while the effects on dorsal horn neurones were smaller. A minor effect of XE-991 on dorsal horn neurones has been observed in intracellular recordings obtained in rats (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005). The lack of effect of XE-991 on cumulative depolarization may be explained by the little impact that this compound has on dorsal horn neurones and, consequently, on their synaptic input to motor neurones.

The concentration of XE-991 used here was sufficient to produce complete blockade of the effects of the specific

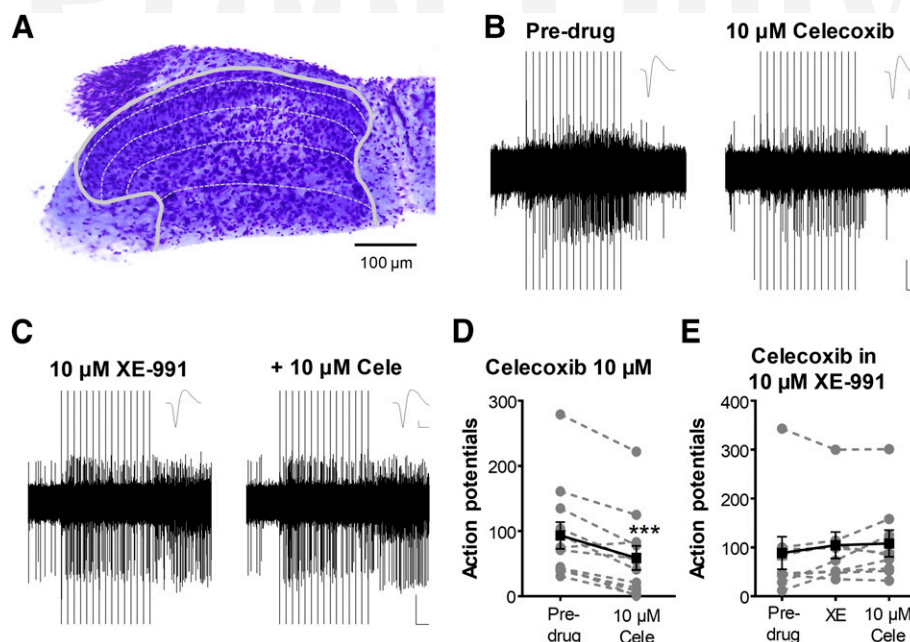


Fig. 6. Effects of celecoxib on the activity of superficial dorsal horn neurones. (A) Microphotograph showing a transverse section of the spinal cord slice stained with toluidine (dorsal side up) with a reconstruction of its borders and laminar organization. The slice contained both sides of the spinal cord, but only one side is shown in the image for clarity. (B) Original recordings showing an example of the effects of 10 μM celecoxib on action potential firing. (C) Illustration of the lack of effect of celecoxib after K_v7 channel blockade with XE-991. Insets show the average of all action potentials in each condition. Calibration bars for all recordings: 0.3 mV and 2 seconds (0.2 mV and 1 millisecond for insets). (D) Graph showing the effects of celecoxib on action potential firing in response to repetitive dorsal root stimulation in the 12 neurones tested. Celecoxib had depressant effects on neuronal firing ($P < 0.001$; paired t test). (E) Graph summarizing the effects of celecoxib at 10 μM after K_v7 channel blockade with XE-991 in the nine neurones tested. XE-991 had no effect, but prevented those of celecoxib. For both graphs, values for individual neurones are shown in gray; mean \pm S.E.M. values for all neurones included in graph are indicated in black. Asterisks (***) $P < 0.001$ indicate statistically significant differences from predrug values as obtained using a paired t test.

K_v7 opens *N*-(2,4,6-trimethylphenyl)-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamide (ML213) and *N*-(2-chloro-5-pyrimidinyl)-3,4-difluorobenzamide (ICA-069673) in previous experiments (Vicente-Baz et al., 2016). We have also proof to our satisfaction that XE-991 does not prevent the effects of 1 μM diazepam, an allosteric modulator of GABA-A receptors under identical experimental conditions (not shown). Thus, we believe that the effects of XE-991 should be considered effective and selective for K_v7 channels. Under these conditions of specific K_v7 channel blockade, celecoxib had no effect on spinal reflexes. Also relevant is the finding that XE-991 prevented the depressant effects of celecoxib on the responses of dorsal horn neurones to C-fiber activation. This shows that early sensory processing of nociceptive information is depressed by celecoxib using a mechanism that likely involves K_v7 channels as well.

Further evidence supporting the implication of K_v7 channels on celecoxib depression of spinal nociceptive transmission was obtained in experiments with DMC, a structural analog of celecoxib that lacks COX blocking activity (Kardosh et al., 2005). This compound produced depressant effects on spinal reflexes similar to those of celecoxib, that were also abolished by XE-991 application.

All these observations support a role for K_v7 channels on celecoxib action although a minor contribution of other targets might be possible. Celecoxib can interact with other targets like sodium and calcium channels which may also contribute to its observed effects (Park et al., 2007; Brueggemann et al., 2009). Although experiments with XE-991 may suggest direct actions on K_v7 channels, K_v7 channel blockade may depolarize

resting potential originating an inactivation of sodium and calcium channels, also preventing celecoxib effects mediated by these other channels. We have shown previously that spinal neurones can be depolarized by the application of 10 μM XE-991 (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005). Depolarizations ranged from 1 to 5 mV, with higher values found in motor neurones, which also showed more negative potentials. These small depolarizations are unlikely to substantially affect high-threshold calcium channels or sodium channels to avoid subsequent actions of celecoxib. However, further studies will be necessary to definitively rule out this possibility.

In summary, the present results prove the concept that K_v7 channels are relevant potential mediators of the antinociceptive actions of celecoxib acting on the spinal cord. Although the results have to be interpreted cautiously due to the limitations of the present experimental approach, it is clear that celecoxib produces depression of the responses of sensory neurones and spinal nociceptive reflexes activating nonspecific targets. Although several nonspecific targets have been identified, the present results are consistent with an involvement of K_v7 channels in these actions of celecoxib. In conclusion, we suggest that celecoxib may combine its main peripheral actions as a blocker of COX enzymes, with activity at K_v7 channels located in spinal nociceptive circuits to achieve analgesia.

Authorship Contributions

Participated in research design: Lopez-Garcia, Rivera-Arconada.
 Conducted experiments: Vicente-Baz.
 Performed data analysis: Vicente-Baz, Rivera-Arconada.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Vicente-Baz, Lopez-Garcia, Rivera-Arconada.

References

- Blackburn-Munro G and Jensen BS (2003) The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **460**:109–116.
- Brueggemann LI, Mackie AR, Mani BK, Cribbs LL, and Byron KL (2009) Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on vascular smooth muscle ion channels may account for differences in cardiovascular risk profiles. *Mol Pharmacol* **76**:1053–1061.
- Clemett D and Goa KL (2000) Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs* **59**:957–980.
- Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, and Williams KM (2000) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* **38**:225–242.
- Dirig DM, Isakson PC, and Yaksh TL (1998) Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **285**:1031–1038.
- Du XN, Zhang X, Qi JL, An HL, Li JW, Wan YM, Fu Y, Gao HX, Gao ZB, Zhan Y, et al. (2011) Characteristics and molecular basis of celecoxib modulation on Kv7 potassium channels. *Br J Pharmacol* **164**:1722–1737.
- Frolov RV and Singh S (2014) Celecoxib and ion channels: a story of unexpected discoveries. *Eur J Pharmacol* **730**:61–71.
- Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, La Manno G, Sharma N, Borgius L, Kiehn O, et al. (2018) Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* **21**:869–880.
- Hay C and de Belleruche J (1997) Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport* **8**:1249–1251.
- Hedo G, Laird JM, and Lopez-Garcia JA (1999) Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience* **92**:309–318.
- Herrero JF, Laird JM, and López-García JA (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* **61**:169–203.
- Hirano K, Kuratani K, Fujiyoshi M, Tashiro N, Hayashi E, and Kinoshita M (2007) Kv7.2-7.5 voltage-gated potassium channel (KCNQ2-5) opener, retigabine, reduces capsaicin-induced visceral pain in mice. *Neurosci Lett* **413**:159–162.
- Inoue N, Ito S, Tajima K, Nogawa M, Takahashi Y, Sasagawa T, Nakamura A, and Kyoi T (2009) Etodolac attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J Pharmacol Sci* **109**:600–605.
- Jentsch TJ (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* **1**:21–30.
- Kalgutkar AS, Marnett AB, Crews BC, Rimmel RP, and Marnett LJ (2000) Ester and amide derivatives of the nonsteroidal antiinflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Med Chem* **43**:2860–2870.
- Kardosh A, Wang W, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen TC, and Schönthal AH (2005) Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **4**:571–582.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, et al. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**:644–648.
- Lee IO and Seo Y (2008) The effects of intrathecal cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, or nonselective inhibitors on pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. *Anesth Analg* **106**:972–977.
- Lizarraga I, Chambers JP, and Johnson CB (2006) Depression of NMDA-receptor-mediated segmental transmission by ketamine and ketoprofen, but not L-NAME, on the in vitro neonatal rat spinal cord preparation. *Brain Res* **1094**:57–64.
- Lopez-Garcia JA and Laird JM (1998) Central antinociceptive effects of meloxicam on rat spinal cord in vitro. *Neuroreport* **9**:647–651.
- Lucas S (2016) The pharmacology of indomethacin. *Headache* **56**:436–446.
- Lucas-Romero J, Rivera-Arconada I, Roza C, and Lopez-Garcia JA (2018) Origin and classification of spontaneous discharges in mouse superficial dorsal horn neurones. *Sci Rep* **8**:9735.
- Malmberg AB and Yaksh TL (1992) Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **263**:136–146.
- Mazo I, Roza C, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, and Lopez-Garcia JA (2015) Effects of centrally acting analgesics on spinal segmental reflexes and wind-up. *Eur J Pain* **19**:1012–1020.
- Mi Y, Zhang X, Zhang F, Qi J, Gao H, Huang D, Li L, Zhang H, and Du X (2013) The role of potassium channel activation in celecoxib-induced analgesic action. *PLoS One* **8**:e54797.
- Nishiyama T (2006) Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* **50**:228–233.
- Park SY, Kim TH, Kim HI, Shin YK, Lee CS, Park M, and Song JH (2007) Celecoxib inhibits Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **1148**:53–61.
- Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al-Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, Burbidge SA, Main M, et al. (2003) KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* **23**:7227–7236.
- Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, et al. (1997) Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* **40**:1347–1365.
- Rezende RM, Paiva-Lima P, Dos Reis WGP, Camêlo VM, Faraco A, Bakhle YS, and Francischi JN (2012) Endogenous opioid and cannabinoid mechanisms are involved in the analgesic effects of celecoxib in the central nervous system. *Pharmacology* **89**:127–136.
- Rivera-Arconada I and Lopez-Garcia JA (2005) Effects of M-current modulators on the excitability of immature rat spinal sensory and motor neurones. *Eur J Neurosci* **22**:3091–3098.
- Rivera-Arconada I, Martinez-Gomez J, and Lopez-Garcia JA (2004) M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* **46**:598–606.
- Rivera-Arconada I, Roza C, and Lopez-Garcia JA (2009) Enhancing m currents: a way out for neuropathic pain? *Front Mol Neurosci* **2**:10.
- Rivera-Arconada I, Roza C, and Lopez-Garcia JA (2016) Spinal reflexes and windup in vitro: effects of analgesics and anesthetics. *CNS Neurosci Ther* **22**:127–134.
- Rome LH and Lands WE (1975) Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:4863–4865.
- Roza C, Mazo I, Rivera-Arconada I, Cisneros E, Alayón I, and López-García JA (2016) Analysis of spontaneous activity of superficial dorsal horn neurones in vitro: neuropathy-induced changes. *Pflugers Arch* **468**:2017–2030.
- Sathyamurthy A, Johnson KR, Matson KJE, Dobrott CI, Li L, Ryba AR, Bergman TB, Kelly MC, Kelley MW, and Levine AJ (2018) Massively parallel single nucleus transcriptional profiling defines spinal cord neurons and their activity during behavior. *Cell Rep* **22**:2216–2225.
- Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, and Isakson PC (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:13313–13318.
- Sun YH, Dong YL, Wang YT, Zhao GL, Lu GJ, Yang J, Wu SX, Gu ZX, and Wang W (2013) Synergistic analgesia of duloxetine and celecoxib in the mouse formalin test: a combination analysis. *PLoS One* **8**:e76603.
- Tatulian L, Delmas P, Abogadie FC, and Brown DA (2001) Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci* **21**:5535–5545.
- Vardeh D, Wang D, Costigan M, Lazarus M, Saper CB, Woolf CJ, Fitzgerald GA, and Samad TA (2009) COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest* **119**:287–294.
- Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, and Rivera-Arconada I (2016) Effects of novel subtype selective M-current activators on spinal reflexes in vitro: comparison with retigabine. *Neuropharmacology* **109**:131–138.
- Wickenden AD, Zou A, Wagoner PK, and Jegla T (2001) Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol* **132**:381–384.
- Yamamoto T and Nozaki-Taguchi N (1996) Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res* **739**:104–110.
- Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, and Isakson PC (1997) Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:1069–1075.
- Zheng Q, Fang D, Liu M, Cai J, Wan Y, Han JS, and King GG (2013) Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* **154**:434–448.
- Zhu X and Eisenach JC (2003) Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* **99**:1175–1179.

Address correspondence to: Ivan Rivera-Arconada, Dpt. Biología de Sistemas (Área Fisiología), Edificio de Medicina, Campus Universitario, Carretera N-2 Km 33.600, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, 28805 Madrid, Spain. E-mail: ivan.rivera@uah.es

Capítulo 3

Spinal Actions of the NSAID Diclofenac on
Nociceptive Transmission in Comparison to the K_v7
Channel Opener Flupirtine

Spinal Actions of the NSAID Diclofenac on Nociceptive Transmission in Comparison to the K_v7 Channel Opener Flupirtine

Jorge Vicente-Baz and Ivan Rivera-Arconada*

Department of Systems Biology (Physiology), Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Abstract—NSAIDs are the drugs most commonly used to alleviate pain. Despite being a heterogeneous group of compounds, all of them share a mechanism of action based on blockade of COXs enzymes, which confers them anti-inflammatory and analgesic properties. Diclofenac is a NSAID with preferred activity on COX-2 isozymes, but additionally, other targets may be implicated in its analgesic activity. Among them, diclofenac may facilitate the activity of K_v7 channels, that have been previously recognized as potential therapeutic targets in analgesia. In this study, the antinociceptive actions of diclofenac acting at the spinal level and the role of K_v7 channels in its effects were evaluated. Electrophysiological recordings of spinal reflexes and responses of dorsal horn neurons were obtained using *in vitro* spinal cord preparations from neonatal mice. Diclofenac, applied at clinically relevant concentrations to the entire preparation, depressed wind-up of spinal reflexes with a pattern similar to that of flupirtine, an analgesic with activity as K_v7 channel opener. Depressant actions of both compounds were strongly reduced after K_v7 channel blockade with XE-991, indicating the implication of these channels in the observed effects. Flupirtine, but not diclofenac, also reduced action potential firing of dorsal horn neurons in response to electrical activation of nociceptive afferents, suggesting differences in the actions of both compounds on K_v7 channel configurations present in sensory areas of the cord. Results demonstrate previously unknown central actions of diclofenac on K_v7 channels located in spinal circuits, expanding the knowledge about its pharmacological actions. © 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: spinal cord, M-current, pain, analgesia, XE-991, inflammation.

INTRODUCTION

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) constitute a heterogeneous class of compounds from a chemical point of view. These drugs are widely prescribed and used for pain treatment. Analgesic effects of NSAIDs are mainly achieved by the blockade of COXs enzymes and the consequent inhibition of the synthesis of pro-inflammatory mediators as prostanoids (FitzGerald and Patrono, 2001; Burian and Geisslinger, 2005). This mechanism of action allows NSAIDs to be very efficacious in pathological pain situations where tissue damage occurs, at the periphery. But central actions of NSAIDs may also contribute to their analgesic effects. Intrathecal application of a variety of NSAIDs has been shown to reduce hyperalgesia in animal models of inflammatory pain

(Malmberg and Yaksh, 1992; Dirig et al., 1998; Yaksh et al., 2001). However, the mechanisms mediating central effects of NSAIDs are not clear, since they have been shown to interact with a number of targets other than COX enzymes (Hamza and Dionne, 2009).

Diclofenac is a NSAIDs that may possess central and peripheral sites of action. Systemic application reduces formalin induced nociception (Santos et al., 1998), but diclofenac also inhibits hyperalgesia in a model of postoperative pain when applied intrathecally (Narai et al., 2012). Although its main mechanism of action is related with COX blockade (FitzGerald and Patrono, 2001), several reports highlight the effects of diclofenac on targets such as transmitter systems (Gan, 2010) and ion channels (Gwanyanya et al., 2012). Diclofenac activate voltage dependent potassium channels of the K_v7 family at micromolar concentrations (Peretz et al., 2005), and actions on this target may be relevant for antinociceptive effects of diclofenac, as has been recently shown for the NSAID celecoxib (Mi et al., 2013; Vicente-Baz et al., 2019).

Homo- and heteromeric configurations of neuronal K_v7 channels ($K_v7.2-5$) yield outward potassium currents (M-currents) with slow activation kinetics and

*Corresponding author. Address: Dpt. Biología de Sistemas (Área Fisiología) Edificio de Medicina, Campus Universitario Carretera N-2 Km 33.600 Universidad de Alcalá 28805 Alcalá de Henares Madrid, Spain. Tel: +34-91-885-5106.

E-mail address: ivan.rivera@uah.es (I. Rivera-Arconada).

Abbreviations: ACSF, artificial cerebrospinal fluid; COX, cyclooxygenase; Dil, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; MEA, multielectrode array; NSAID, Nonsteroidal anti-inflammatory drug; VRP, ventral root potential.

no inactivation, that possess a great influence on resting membrane potential and repetitive firing in neurons (Jentsch, 2000). K_v7 channels show a close homology between species, even in invertebrates, suggesting an essential function in cellular physiology (Singh et al., 1998). K_v7 channels are widely expressed along pain pathways (Rivera-Arconada et al., 2009) and facilitation of K_v7 channel opening with retigabine has been shown to reduce nociceptive behaviours in animal models of pain (Blackburn-Munro and Jensen, 2003; Passmore et al., 2003; Hirano et al., 2007). At the spinal level, pharmacological facilitation of the M-current modulates the excitability of sensory and motor neurons thus affecting spinal nociceptive processing (Rivera-Arconada et al., 2004; Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005). All these previous reports point to a fundamental role of K_v7 channels at the initial phases of nociceptive information processing.

The main objective of this work was to study the spinal antinociceptive effects of diclofenac and to assess the possible mediation of K_v7 channels in such effects. We used extracellular electrophysiological recordings from sensory and motor neurons of the mouse spinal cord and pharmacological tools for the study of K_v7 channels. These include flupirtine, an analgesic with activity as K_v7 channel opener (Szelenyi, 2013), and XE-991, a K_v7 channel blocker (Zaczek et al., 1998). To maximize the presence of COX enzymes in our preparations, we performed an intraplantar injection of carrageenan prior to spinal cord extraction, a model that allows detection of hyperreflexia *in vivo* and *in vitro* (Hedo et al., 1999). Results are discussed in the framework of known effects of diclofenac and flupirtine on specific K_v7 channel subunits.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

In-house bred neonatal CD1 mice ($n = 41$) between 6–10 days old and 3.7–8.7 g of weight were used. Pups were maintained with their parents under a 12 h:12 h light–dark cycle and a humidity of $55 \pm 15\%$ until the extraction of the spinal cord. Procedures followed European Union and local normative for animal use in experimentation and comply with ARRIVE guidelines. All experimental designs were accepted by the ethics committee of the University of Alcalá and the regional government of Madrid (Ref. PROEX 018/16). We reduced the use of animals to the least number that permitted a correct understanding of the assays.

Carrageenan model of paw-inflammation and behavioural assays

All experiments were made using spinal cords extracted from animals that have undergone a peripheral inflammatory process. Carrageenan was introduced in both hind paws by intraplantar injection (3% in saline; 30 μ l). Before carrageenan injection and 20 h after its application we measured the paw diameter and mechanical withdrawal threshold to evaluate the inflammatory process and the development of mechanical allodynia, respectively. Paw diameter was measured using a hand calliper. Mechanical threshold

was assayed with calibrated Von Frey filaments, and was measured as the lowest intensity that produced a clear withdrawal response in at least three out of 5 trials. All measured values were included within the range from 0.008 to 2 g. Only data from the side used for electrophysiological recordings was considered for statistical analysis.

In vitro preparations of the spinal cord and electrical stimulation of the dorsal root

Urethane anaesthesia (2 mg/kg i.p.) was used for the spinal cord extraction by means of a dorsal laminectomy. Recordings of spinal reflexes were made using preparations of the entire spinal cord. For multielectrode recordings, hemisectioned spinal cord preparations were used, and to facilitate electrode penetration the medial side was situated upward. To avoid movements of the preparation during recordings, the cords were fixed with pins to the base of a recording chamber filled with Sylgard. Spinal cords were continuously superfused (4–6 mL/min) with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) that was oxygenated with carbogen (95% O_2 ; 5% CO_2). ACSF (pH 7.4) had the following composition: 127 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 22 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose. The preparation was allowed to stabilise after the extraction during a period of 60 min before electrophysiological recordings began.

Glass suction microelectrodes were used for the electrical stimulation. A dorsal root (usually L4) was fitted inside the electrode to activate the primary afferent fibres. Electrical stimulation consisted in C-fibre intensity stimuli (200 μA , 200 μs) that were applied at 1 Hz in a train of 15 shocks to produce responses type wind-up (Martinez-Gomez and Lopez-Garcia, 2005). The interval for the application of successive trains was 30 min.

Ventral root reflex recordings

A tight-fitting glass suction electrode was used for recording spinal reflexes elicited in the L4 ventral root. Ventral root recordings were amplified with a Multiclamp 7A (Molecular Devices, California, USA) and the frequency of sampling was adjusted to 6 kHz. Analysis of recording was made offline with Spike 2 software (CED, Cambridge, UK). DC signals allowed to record ventral root potentials (VRP) as sustained changes in basal potential of motoneuronal populations. A cumulative VRP was recorded from DC signals after C-fibre repetitive stimulation of the dorsal root and was quantified as integrated area during 24 s. The firing of action potentials in the population of motor neurons was recorded as fast spike-like events, for this the original DC signal was filtered between 200 and 1200 kHz with a digital band-pass filter to obtain AC signals (Rivera-Arconada et al., 2004). Wind-up is a response characterised by a progressive increase in action potential firing that take place in neurons of the nociceptive pathway in response to repetitive activation of C-fibres (Herrero et al., 2000). Spike wind-up of spinal reflexes was mea-

sured from AC recordings using a threshold criterion, spikes in a time window between 100 and 950 ms from stimulus artefact for every single shock were counted, in addition all spikes were summated to obtain total spike count values. A stable baseline response was usually obtained after 2–4 repetitions of the train of stimuli. Responses obtained in such way were stable for prolonged periods of time and allowed long-lasting pharmacological experiments (Vicente-Baz et al., 2019).

Dorsal horn neurons' recordings with multielectrodes and recovery of their location

Arrays of multielectrodes (MEAs) from Neuronex Technologies (USA) were used. The models used had 4 shanks with 4 iridium recording sites 50–100 μm apart from each other (A4 \times 4 3 mm-50/100-125-177-A16). We situated the MEAs over the deep dorsal horn by visual guidance and introduced them up to the desired position using a motorised micromanipulator. MEA recordings were passed through a MPA81 preamplifier (Multichannel Systems, Germany) that amplified the signals $\times 10$, and then were further amplified $\times 500$ with a Cyberamp (Molecular Devices, California, USA). A digital band-pass filter (between 300 Hz and 3 kHz) was used and finally signals were stored at 20 kHz for offline analysis (Power 1401, CED, UK) (Roza et al., 2016).

Spike shape parameters were used for spike sorting using Spike 2. Only data from single unit activity unequivocally classified was used in subsequent analysis. Up to four neurons could be studied from a single experiment. Dorsal root stimulation evoked firing of action potentials that was analysed counting spikes elicited from the 50 ms after electrical artefact. When responses to repetitive stimuli were stable during 2 or 3 stimulation cycles drugs were applied. Recordings from spinal neurons *in vitro* using MEAs have shown stable responses for prolonged periods of time (Vicente-Baz et al., 2019).

Dil labelling was used to estimate the approximate position of the MEA electrode inside the cord. After the completion of the experiment, the MEA was substituted by an identical microelectrode and then situated in the position of the recording with the motorised micromanipulator. This manoeuvre was employed to avoid the damage of the MEA and to elude the prolonged exposition of the neurons to Dil during the recording. After staining, the cord was immersed in paraformaldehyde 4% overnight, included in gelatine and sectioned at 100 μm in the transversal plane using a cryostat. The trajectory of the MEA inside the cord was visualized as Dil fluorescence and the situation of the recording site was documented (Roza et al., 2016).

Drugs and chemicals

ML213 and flupirtine were acquired from Tocris bioscience (Bristol, UK). Carrageenan lambda, diclofenac, XE-991, the reactives for the ACSF and Dil were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The ACSF was prepared daily. Diclofenac was dissolved at

50 mM in milliQ water and used within 3 hours after its preparation. The remaining drugs were dissolved in DMSO (10–20 mM) and stored as stocks at -20°C . Just prior to use, drugs were diluted down in ACSF to the desired concentration. Superfusion of drugs was made to the entire preparation during at least 25 min to allow an adequate equilibration within the tissue. Each preparation received applications of only one of the K_v7 channels openers (Flupirtine, ML213) or diclofenac and up to three growing concentrations were used. In a different group of experiments, the K_v7 channel blocker XE-991 was perfused a minimum of 60 minutes before the application of these compounds to prevent K_v7 channels activation.

Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for statistical analysis on raw data. All set of data were analysed using the Shapiro-Wilk normality test to check if the values were sampled from a population that follows a Gaussian distribution. For data showing a Gaussian distribution mean \pm standard error of mean (S.E.M.) is shown and parametric tests are used to compare means: paired *t*-test for comparison of pairs of data, and repeated measures One-way ANOVA with multiple comparisons using Bonferroni's multiple comparisons test for three or more data sets. If data failed to pass normality test or data values were obtained from a non-continuous variable, values are shown as median and interquartile range (IQR, 25th and 75th quartiles) and comparison of medians is used: Wilcoxon matched-pairs signed ranks test for pairs of data and Friedman test with Dunn's multiple comparisons test for three or more paired groups.

RESULTS

Diclofenac and flupirtine depress spinal reflexes of sensitised cords *in vitro*

Since central sensitization may produce an upregulation of COX enzymes, we studied the potential effects of diclofenac on spinal reflexes using cords obtained from animals subjected to paw inflammation. These animals were injected with carrageenan via intraplantar to induce an experimental peripheral inflammation in the hind paws prior to the spinal cord extraction procedure. Twenty hours after the induction of inflammation the animals showed a significant paw swelling and mechanical allodynia. The median paw diameter increased from 2.2 mm (IQR 2.1–2.275) before to 2.8 mm (IQR 2.625–2.9) after inflammation ($n = 36$; Wilcoxon test, $Z = 5.23$, $p \leq 0.0001$). The median mechanical force to elicit a paw withdrawal reflex decreased significantly from 1 g (IQR 1–1.4) in control to 0.04 g (IQR 0.04–0.07) after inflammation (Wilcoxon test, $Z = 5.23$, $p \leq 0.0001$).

Repetitive stimulation of the dorsal root at an intensity recruiting C-fibres produced a cumulative VRP and spike wind-up (Fig. 1). The integrated area of the cumulative VRP was $17.9 \pm 1.4 \text{ mV}^*\text{s}$ and total spike counts were

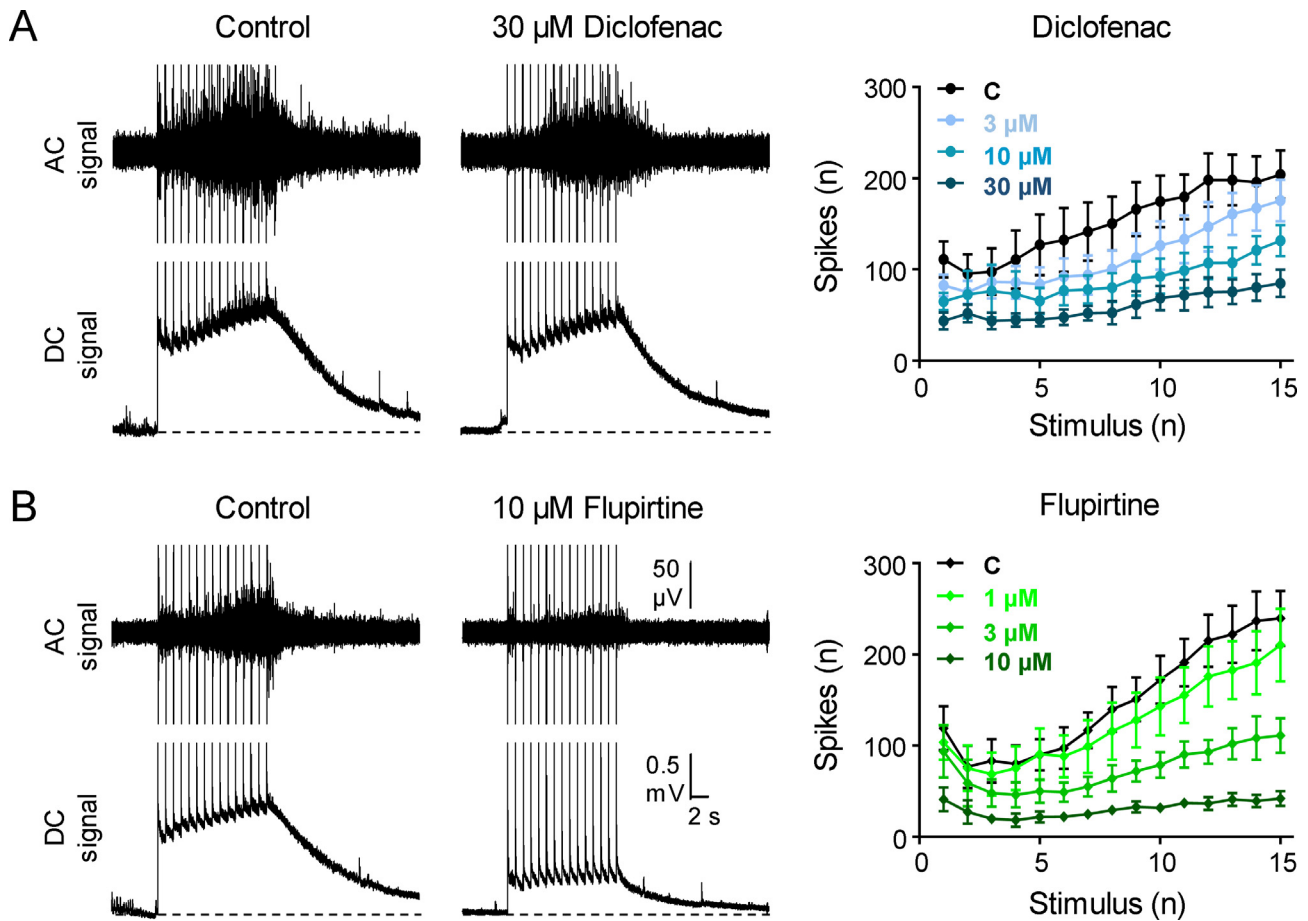


Fig. 1. Effects of diclofenac and flupirtine on responses to repetitive stimulation (15 stimuli at 1 Hz) of the dorsal root at C-fibre intensity (200 μ A, 200 μ s). In control conditions (left panels), stimulation originates a cumulative VRP in the DC signals and a concomitant wind-up of spikes measured from the AC signals (gradual thickening of baseline). In this and subsequent recordings vertical lines at regular intervals correspond to stimulus artefacts, dashed lines in DC signals were included for aiding to judge the amount of cumulative VRP. Diclofenac (A) and Flupirtine (B) showed a large depression of spike wind-up (see wind-up profile in the graphs). However, note the difference in the effects produced by each drug on cumulative VRP (DC signal). Calibration bars in (B) also apply to (A).

2086 \pm 229 ($n = 18$). Application of diclofenac or flupirtine produced clear depressant effects on spinal reflexes and wind-up (see examples in Fig. 1). Both compounds produced a significant depression of total spike counts (repeated measures one-way ANOVA, $F(3, 15) = 12.61, \eta^2 = 0.42$ for diclofenac and $F(3, 12) = 15.16, \eta^2 = 0.42$ for flupirtine; $p \leq 0.001$ for both drugs) elicited by repetitive stimuli when applied at medium and high concentrations (10 and 30 μ M for

diclofenac ($n = 6$); 3 and 10 μ M for flupirtine ($n = 5$); Table 1) and a strong reduction of responses to the final stimuli of the train, flattening the spike wind-up curve (Fig. 1). Flupirtine also reduced the cumulative VRP produced by repetitive stimuli ($F(3, 12) = 23.01, \eta^2 = 0.50, p \leq 0.001$) when applied at 3 and 10 μ M, whereas diclofenac produced a light depression that didn't reach statistical significance ($F(3, 15) = 2.79, \eta^2 = 0.04, p = 0.08$; Table 1).

Table 1. Summarises the effects of diclofenac and flupirtine on spinal reflexes. Direct data values for total spike counts and integrated area of the cumulative VRP (Cum. VRP) in control conditions and at each of the concentrations tested are shown. Statistical analysis was performed on raw data using repeated measures One-Way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Asterisks stand for statistically significant differences from control values obtained using Bonferroni, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$

Diclofenac ($n = 6$)	Control	3 μ M	10 μ M	30 μ M
Total spike counts (n)	2282 \pm 391	1962 \pm 296	1488 \pm 192*	899 \pm 139***
Cum. VRP (mV/s)	14.5 \pm 1.6	14.7 \pm 2.0	13.6 \pm 2.3	12.4 \pm 2.3
Flupirtine ($n = 5$)	Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M
Total spike counts (n)	2455 \pm 546	1982 \pm 461	1405 \pm 409*	547 \pm 117***
Cum. VRP (mV/s)	18.4 \pm 2.1	16.5 \pm 2.0	13.0 \pm 1.5**	9.2 \pm 1.1***

Role of K_v7 channels in the depressant effects of diclofenac and flupirtine on spinal reflexes

The results described above indicate that both diclofenac and flupirtine depress segmental transmission across nociceptive pathways. Our next step was to explore whether K_v7 channel opening mediated the effects of these compounds. To this end K_v7 channels were blocked by bath application of XE-991 to prevent channel activation, and then diclofenac or flupirtine were co-applied at the same concentrations tested before.

XE-991 was applied at 10 μM during 90 min to ensure a complete blockade of K_v7 channels. Blockade of K_v7 channels produced a large increase in spike counts to repetitive stimuli from 1537 ± 196 in control to 4147 ± 377 spikes after 10 μM XE-991 (paired *t*-test, *t*(6) = 10.06, *p* ≤ 0.001; *n* = 7). Superfusion of XE-991 did not affect the area of the cumulative VPR in response to repetitive stimuli (20.5 ± 2.8 mV*s in control and 20.9 ± 3.5 mV*s after 10 μM XE-991, *t*(6) = 0.21, *p* = 0.84).

Once the blockade of K_v7 channels had been established, diclofenac or flupirtine were co-applied with XE-991. In the presence of XE-991 the effects of diclofenac (*n* = 4) and flupirtine (*n* = 3) were strongly reduced but not occluded, suggesting the existence of further targets for these drugs in spinal pathways, particularly at the higher concentrations used (see Fig. 2 and Table 2).

Flupirtine but not diclofenac depresses responses of sensory neurons to dorsal root stimulation

Although spinal nociceptive reflexes are dependent on the activation of nociceptive circuits, they also relay upon motor components that may be affected by the compounds. For this reason, we explored the contribution of dorsal horn sensory circuits to the effects observed in the whole reflex pathway.

Extracellular recordings from dorsal horn neurons were performed in 23 hemisected spinal cords obtained from paw-inflamed mice. A total of 38 neurons were successfully isolated from our multiple electrode recordings. Although most recordings included only one or two reliable and clearly identifiable neurons per experiment, in one occasion 4 neurons were isolated. MEAs situation inside the hemisected spinal cord was recovered after Dil labelling and histological processing. Electrode tracks were located approximately in lamina IV–VI, between 116 μm and 525 μm from the sectioned medial side (Fig. 3A).

Diclofenac applied at 10 μM was devoid of effect on responses to repetitive stimuli as obtained from five dorsal horn neurons (*n* = 5 neurons from 4 animals (1,1,1,2); repeated measures one-way ANOVA, *F* (2, 8) = 2.11, *η*² = 0.02, *p* = 0.18; Figs. 3 and 4). When applied at 30 μM, one out of the 5 neurons tested showed a minor depression of responses to 72 % of control (see Fig. 4). Pooling together results from these 5 neurons, their mean number of action potentials was 123 ± 33 in control, 123 ± 34 in 10 μM and 104 ± 22 in 30 μM diclofenac.

In contrast, flupirtine produced a concentration dependent depression of action potential firing in response to repetitive stimuli (Friedman test, *F* (2, 8) = 10, *p* ≤ 0.001) when applied at 3 and 10 μM, that was statistically significant at 10 μM (range between 0% and 37% of control; Dunn's multiple comparison test, *p* ≤ 0.01). The median number of action potentials recorded in control was 30 (IQR 25–66.5) vs 19 (IQR 6.5–31.5) in 3 μM and 3 (IQR 0.5–11) in 10 μM flupirtine (*n* = 5 neurons from 4 animals (1,1,1,2); Figs. 3 and 4).

We then performed experiments with superfusion of XE-991 to examine a possible occlusion of the effects of flupirtine and confirm that the observed effects were in fact mediated by K_v7 channels. No occlusion experiments were performed with diclofenac in view of its very weak effect on dorsal horn neurons.

A 60 min application of XE-991 at 10 μM did not produce a significant change in the responses to repetitive stimuli as recorded from a sample of 12 neurons (from 104 ± 13 to 123 ± 17 action potentials; *n* = 12 neurons from 7 animals (1,1,1,2,2,2,3); paired *t*-test, *t*(11) = 1.62, *p* = 0.13). Blockade of K_v7 channels with XE-991 occluded the effects of 3 μM flupirtine, but a significant reduction was still observed during applications of flupirtine at 10 μM in six out of seven neurons tested (range 11–72% of control; *n* = 7 neurons from three animals (1,2,4); repeated measured ANOVA *F* (2, 12) = 10.3, *η*² = 0.44, *p* ≤ 0.01, Bonferroni's multiple comparisons test *p* ≤ 0.01 for 10 μM). In the presence of XE-991 the mean number of action potentials was 114 ± 18 vs 103 ± 15 in 3 μM flupirtine and 63 ± 12 in 10 μM flupirtine (Figs. 3 and 4).

To confirm the ability of XE-991 to fully block K_v7 channels present in dorsal horn circuits, some additional experiments were performed with the novel and specific K_v7 opener ML213. ML213 applied at 1 μM strongly depressed responses to repetitive stimulation from 102 ± 16 action potentials in control to 36 ± 11 in ML213 (*n* = 6 neurons from four animals (1,1,2,2); paired *t*-test, *t*(5) = 3.05, *p* ≤ 0.05). In another set of six neurons, depressant effects of ML213 were fully prevented by K_v7 channel blockade with XE-991. The mean of number of action potentials were 137 ± 29 in XE-991 and 164 ± 34 after co-application of ML213 (*n* = 6 neurons from four animals (1,1,2,2); paired *t*-test, *t*(5) = 1.85, *p* = 0.123, not shown).

DISCUSSION

Our results show direct depressant effects of diclofenac on spinal nociceptive transmission, manifested as a profound inhibition of the wind-up of spinal reflexes, a signature common to several analgesics with different mechanisms of action (Mazo et al., 2015). Results are in agreement with a previous report which shows reduction of pain sensitivity in behaving animals when diclofenac is applied locally to the spinal cord (Narai et al., 2012). In addition, other NSAIDs produce antihyperalgesic effects in a variety of animal models of pain when applied using intrathecal route of administration (Malmberg and Yaksh, 1992; Dirig et al., 1998; Yaksh

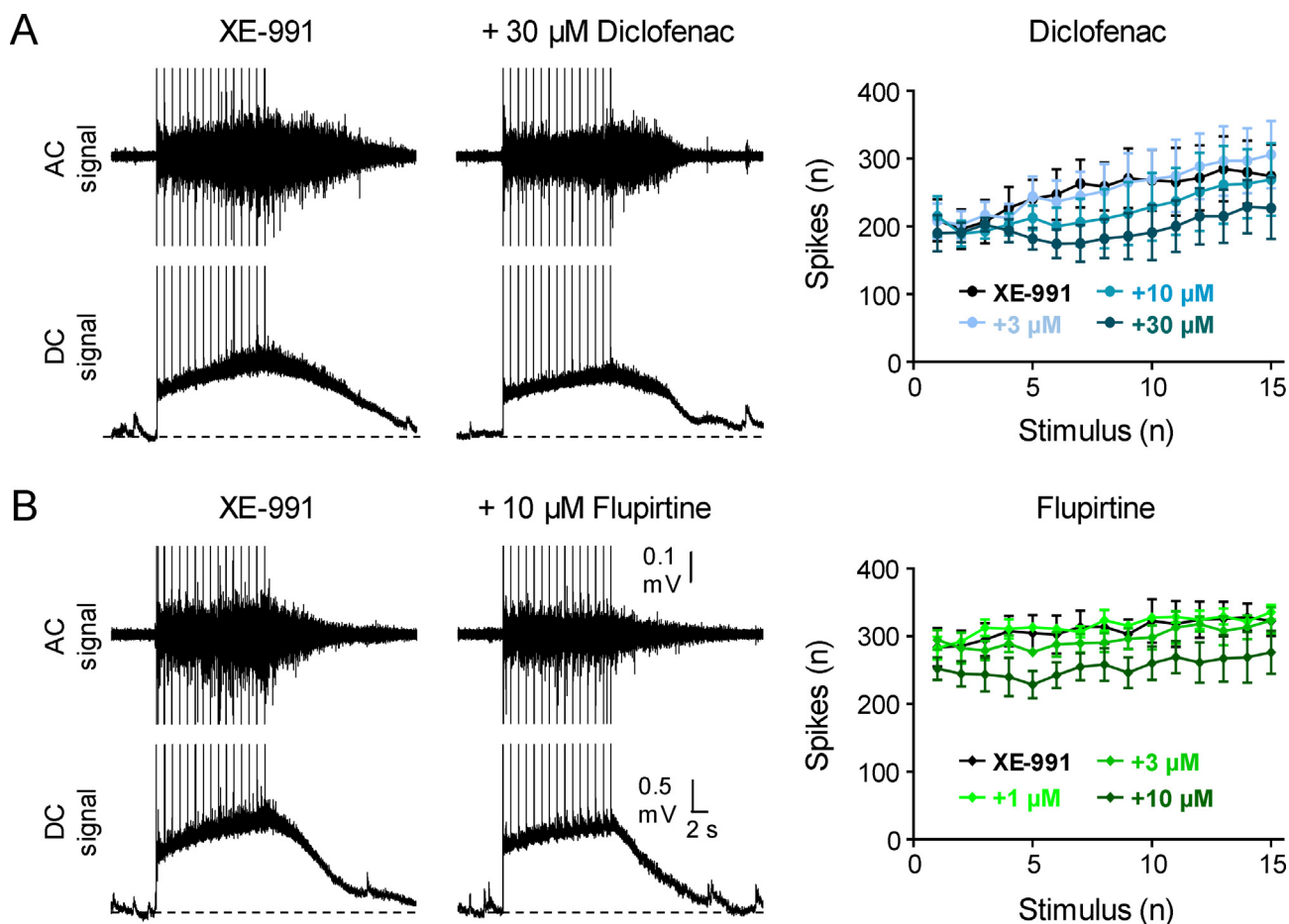


Fig. 2. Influence of K_v7 channels blockade on the effects of diclofenac and flupirtine. Figure shows the effects of diclofenac and flupirtine on ventral root reflexes, elicited by C-fibre intensity stimulation of the dorsal root at 1 Hz, after K_v7 channels blockade. Spike firing in AC signals was clearly increased by XE-991 (left panels) compared to control recordings (see Fig. 1). Under these conditions, the effects of diclofenac (A) and flupirtine (B) were strongly reduced but not fully abolished. Calibration bars in (B) also apply to (A).

Table 2. Summarises the effects of diclofenac and flupirtine on total spike counts (repeated measures One-Way ANOVA, $F(3, 9) = 20.1$, $\eta^2 = 0.13$, $p \leq 0.001$ and $F(3, 6) = 9.93$, $\eta^2 = 0.44$, $p \leq 0.01$, respectively) and integrated area of the cumulative VRP (Cum. VRP; $F(3, 9) = 3.93$, $\eta^2 = 0.06$, $p \leq 0.05$ and $F(3, 6) = 16.29$, $\eta^2 = 0.69$, $p \leq 0.01$, respectively) obtained during the blockade of K_v7 channels with 10 μM XE-991. Data shown include values in predrug conditions (90 min in XE-991) and at each concentration tested. Statistical analysis was performed on raw data using Bonferroni's multiple comparisons test following repeated measures One-Way ANOVA. Asterisks stand for statistically significant differences from predrug values obtained using Bonferroni, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$

Diclofenac ($n = 4$)	Predrug (XE-991)	3 μM	10 μM	30 μM
Total spike counts (n)	3768 \pm 562	3816 \pm 546	3363 \pm 541	2955 \pm 415***
Cum. VRP (mV/s)	14.6 \pm 3.6	12.9 \pm 3.0	11.6 \pm 2.7	11.2 \pm 2.6
Flupirtine ($n = 3$)	Predrug (XE-991)	1 μM	3 μM	10 μM
Total spike counts (n)	4653 \pm 374	4737 \pm 116	4461 \pm 221	3815 \pm 358*
Cum. VRP (mV/s)	29.2 \pm 0.5	27.9 \pm 1.4	25.9 \pm 0.5*	24.04 \pm 1.0**

et al., 2001). Effects of diclofenac were observed at concentrations in range of those attained in plasma from humans treated with clinical doses (50 mg, 6 μM ; (Willis et al., 1979; Crook et al., 1982), suggesting that such activity on spinal pathways may be implicated in the actions of diclofenac. However, an important question is whether COX inhibition is involved in the observed depression of spinal reflexes. Previous observations have shown that some NSAIDs depress spinal reflexes only at

concentrations larger than those required to block COXs (Lopez-Garcia and Laird, 1998; Lizarraga et al., 2006). In addition, we have recently shown that celecoxib depresses spinal nociceptive reflexes and responses of sensory dorsal horn neurons *in vitro* by a mechanism independent of COX enzymes (Vicente-Baz et al., 2019).

Several alternative targets have been proposed for diclofenac other than COXs (Lee et al., 2003; Yarishkin et al., 2009; Gan, 2010; Gwanyanya et al., 2012). A study

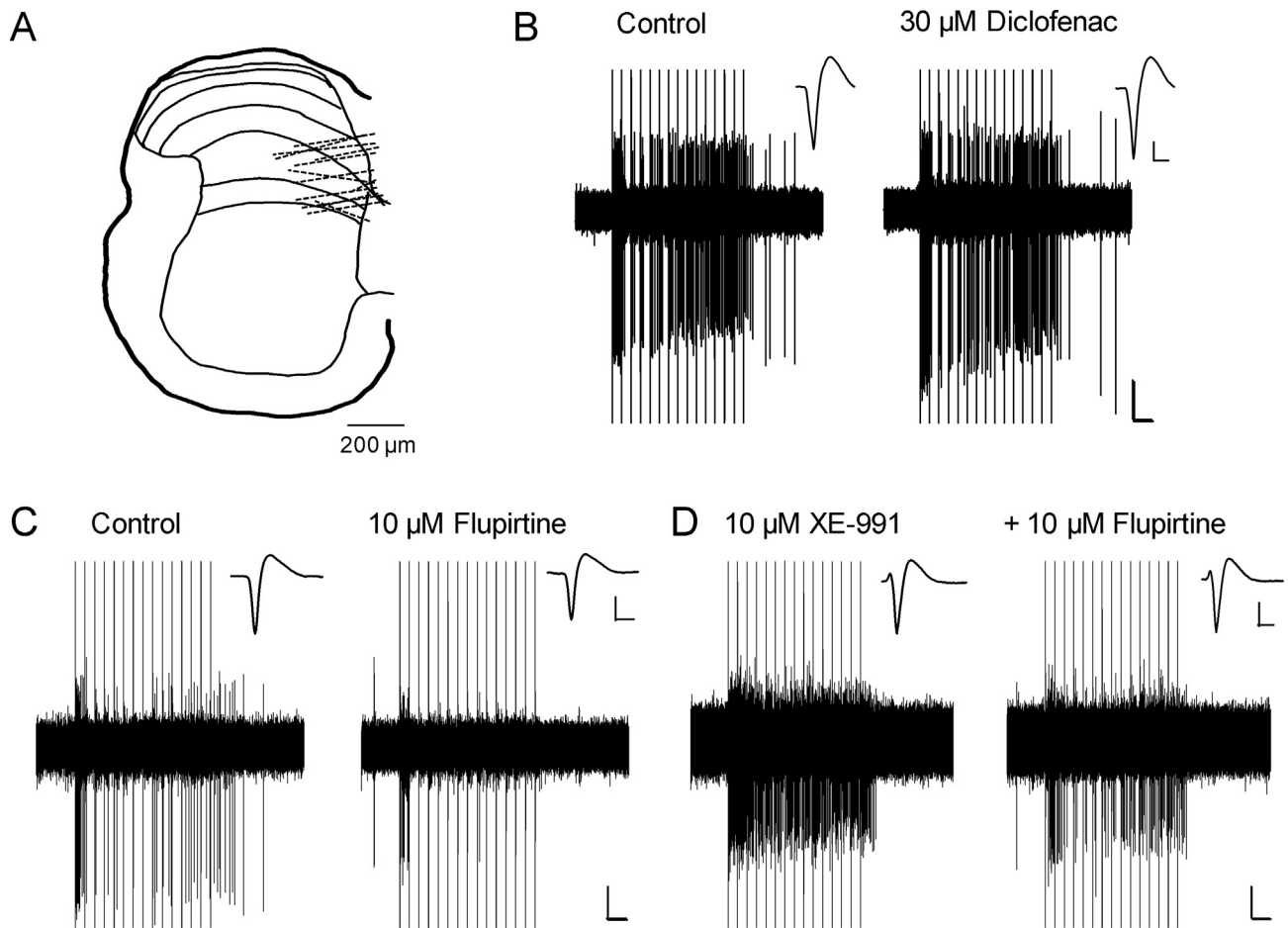


Fig. 3. Effects of diclofenac and flupirtine on the responses of deep dorsal horn neurons. Image in (A) shows a drawing of a section of the hemisected spinal cord. This transverse section is situated with the dorsal side up and includes an approximate drawn of the laminar organization of the cord. Using Dil labelling the estimated position of the multielectrode was recovered. The approximate trajectory of the electrodes through the cord in the 14 experiments in which labelling was recovered is indicated by dashed lines. (B) Shows original recordings from a representative example of one dorsal horn neuron treated with 10 and 30 μM diclofenac, only the maximal concentration is shown. Flupirtine effects are shown in figure (C). Some depressant actions of flupirtine are still present after $\text{K}_{\text{v}7}$ channel blockade with 10 μM XE-991 (D). Flupirtine was applied at 3 and 10 μM in both cases, however figure only shows the highest concentration. Insets are the mean shape of the spike obtained from all action potentials in each condition. Calibration bars values of 0.2 mV and 2 s (0.2 mV and 1 ms for insets) apply for all recordings.

by Peretz et al. (2005) indicated that diclofenac can work as $\text{K}_{\text{v}7}$ channel opener at low micromolar concentrations. $\text{K}_{\text{v}7}$ channels are expressed at all stages of spinal nociceptive processing and its modulation by openers like retigabine depress nociceptive transmission and produce antinociceptive effects (Rivera-Arconada et al., 2009). The most convincing argument in favour of the implication of $\text{K}_{\text{v}7}$ channels on the effects observed here was obtained from prevention experiments with the blocker XE-991. The concentration and application schedule for XE-991 is sufficient to abolish the actions of the specific $\text{K}_{\text{v}7}$ openers ML213 and ICA-069673 on spinal reflexes (Vicente-Baz et al., 2016), and the depressant actions of ML213 on the responses of deep dorsal horn neurons as showed here. Of note, this concentration does not prevent inhibitory actions of other compounds that acts on different targets like diazepam (Vicente-Baz et al., 2019). XE-991 application reduced the effects of diclofenac to great extent, but not completely, suggesting a main implication of $\text{K}_{\text{v}7}$ channels, but also some marginal

actions on other targets. In addition to its known actions on COX enzymes, diclofenac has been reported to interact with L-type calcium and sodium channels, and blockade of these channels may contribute to its depressant effects (Lee et al., 2003; Yarishkin et al., 2009).

To obtain further clues about the implication of $\text{K}_{\text{v}7}$ channels in the actions of diclofenac at the spinal level, we performed equivalent experiments with flupirtine, an analgesic drug with indication for the management of acute and chronic musculoskeletal pain, that acts as a $\text{K}_{\text{v}7}$ channel opener at low concentrations, such as those attained in human analgesia (2 μM in plasma, (Devulder, 2010)). In our hands, flupirtine produced a depression of spinal reflexes in response to C-fibre stimulation, affecting to both spike wind-up and cumulative VRP. $\text{K}_{\text{v}7}$ channel blockade abolished the effects of flupirtine applied at low but not at high concentrations, when some depression remained. This is consistent with the non-selective profile of action of flupirtine, which has been shown to enhance GABAergic inhibitory transmission as

well (Klinger et al., 2012). Additionally, both flupirtine and diclofenac may interact with potassium currents of the delayed rectifier type encoded by $K_v3.1$ channels (Wu et al., 2012; Huang et al., 2013). $K_v3.1$ channels are relevant for action potential repolarisation, enabling high frequency action potential transmission (Labro et al., 2015), and hence actions of the drugs on this target may also contribute to their depressant effects on the excitability of spinal neurons.

The effects of diclofenac on spinal reflexes had some similarities, but were not identical to that of flupirtine, since diclofenac reduced wind-up of motor neurons, but not the underlying cumulative VPR. This dissimilarity may be clarified by the different actions of both compounds on dorsal horn neurons, which provide synaptic inputs to motor circuits. Flupirtine strongly depressed responses of deep dorsal horn neurons to dorsal root stimuli, employing a mechanism that implicate K_v7 channels in a great extent. In contrast, diclofenac had very little influence on dorsal horn neuron's responses. This particular profile of action suggests that diclofenac may depress spinal nociceptive reflexes acting mainly on motor circuits. Compared with the NSAID celecoxib that reduce dorsal horn neurons' responses (Vicente-Baz et al., 2019), diclofenac actions on spinal circuits seem less relevant for early sensory processing. These observations are consistent with behavioural data showing a somewhat higher analgesic potency of celecoxib over diclofenac in rats, despite its lower effect reducing PGE_2 levels (Yoshino et al., 2005).

Considering the ability of diclofenac to act on K_v7 channels, its lack of effect on deep dorsal horn neurons is striking, since the expression of *kcnq* genes has been reported in dorsal horn neurons (Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018) and modulators of K_v7 channels has been shown to alter the excitability of deep dorsal horn neurons as well as motor neurons (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005). In addition, K_v7 channels are also present in nociceptive primary afferents that provide input to spinal cord neurons (Passmore et al., 2003; King and Scherer, 2012). The results obtained with diclofenac may be caused by an asymmetrical expression of specific K_v7 subunits between motor and sensory areas of the cord. A previous work in rats reported a lower influence of K_v7 channel blockade on the excitability of dorsal horn neurons than in motor neurons (Rivera-Arconada and Lopez-Garcia, 2005). Similar results are presented here in mice, showing large effects of XE-991 on the firing

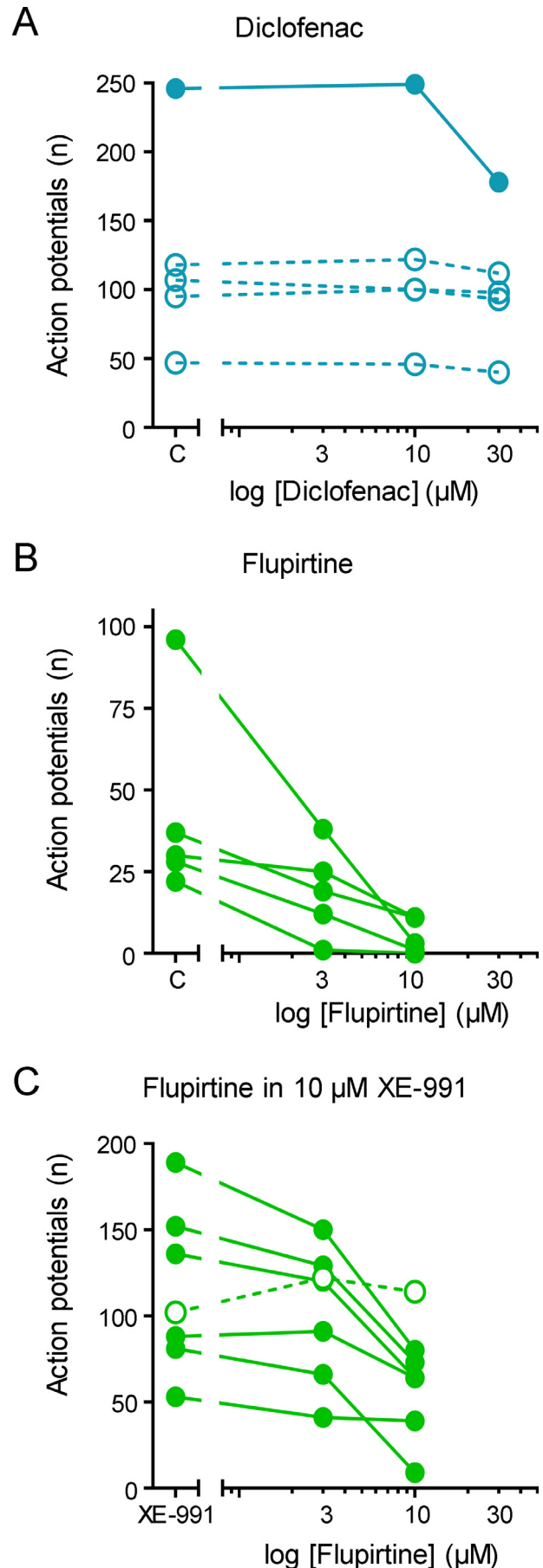


Fig. 4. Summary of drug's effects on deep dorsal horn neurons' responses. Graph in (A) shows the actions of diclofenac on the responses to repetitive dorsal root stimulation at C-fibre intensity for the five neurons tested. For all these graphs, neurons with a decrease in the number of action potentials $\geq 20\%$ are indicated with filled symbols, those with lower or no depressant effects with open symbols and dashed lines. Diclofenac only altered the activity of one deep dorsal horn neuron, while the remaining were unaffected. Graphs in (B) and (C) show the effects of flupirtine in control conditions (B) and after blockade of K_v7 channels (C) as obtained in 5 and 7 neurons, respectively. Note that flupirtine at 10 μM still produced clear depressant effects in most neurons after K_v7 channel blockade.

of motor neurons, but not on dorsal horn neurons' responses, supporting the existence of different activation state and/or subunit composition of K_v7 channels configurations in sensory and motor areas.

Diclofenac activates heteromeric $K_v7.2/3$ channels with an EC_{50} of 2.6 μM , causing an enhancement of maximal current and a hyperpolarising shift of the voltage activation curve (Peretz et al., 2005). However, homomeric $K_v7.5$ channels are strongly blocked by diclofenac with a IC_{50} of 19.9 μM , and activation of $K_v7.4$ channels only occurs at concentrations above 30 μM (Brueggemann et al., 2011). Of note, the inhibitory effects of diclofenac on K_v7 currents also take place in heteromeric channels containing $K_v7.5$ subunits. Considering these actions of diclofenac, it's reasonable to expect a minor effect on dorsal horn neurons' responses to C-fibre activation, since $K_v7.5$ subunits are present in nociceptive primary afferent neurons (King and Scherer, 2012). In contrast, flupirtine acts with similar affinity on different K_v7 channel subunits, increasing maximal conductance and changing the kinetics of several assemblies of K_v7 channels, including native M-currents in dorsal horn neurons (Martire et al., 2004; Klinger et al., 2012; Linley et al., 2012; Szelenyi, 2013). It is interesting to note that neither compound affected $K_v7.1$ channels expressed in cardiac myocytes (Peretz et al., 2005; Yeung et al., 2008).

Our results support the idea that K_v7 channel facilitation is the major mechanism mediating the spinal effects of diclofenac and flupirtine. Dissimilarities in their effects in sensory and motor neurons may depend on differential activation state and/or subunit composition of K_v7 channels configurations. Diclofenac effects could be more related with an effect on motor pathways and may implicate mechanisms additional to the modulation of K_v7 channels. The analgesic flupirtine produced a strong depression of nociceptive transmission acting on both sensory and motor areas and using K_v7 dependent and independent mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Lopez-Garcia for helpful feedback on this manuscript and Miss. Diana Paler for technical assistance.

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant No. SAF2016-77585-R). Jorge Vicente-Baz enjoys a fellowship from the University of Alcalá.

DECLARATIONS OF INTEREST

None

REFERENCES

- Blackburn-Munro G, Jensen BS (2003) The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 460(2–3):109–116. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02924-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02924-2).
- Brueggemann LI, Mackie AR, Martin JL, Cribbs LL, Byron KL (2011) Diclofenac distinguishes among homomeric and heteromeric potassium channels composed of KCNQ4 and KCNQ5 subunits. *Mol Pharmacol* 79(1):10–23. <https://doi.org/10.1124/mol.110.067496>.
- Burian M, Geisslinger G (2005) COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther* 107(2):139–154. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.02.004>.
- Crook PR, Willis JV, Kendall MJ, Jack DB, Fowler PD (1982) The pharmacokinetics of diclofenac sodium in patients with active rheumatoid disease. *Eur J Clin Pharmacol* 21(4):331–334. <https://doi.org/10.1007/BF00637622>.
- Devulder J (2010) Flupirtine in pain management: pharmacological properties and clinical use. *CNS Drugs* 24(10):867–881. <https://doi.org/10.2165/11536230-000000000-00000>.
- Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL (1998) Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285(3):1031–1038.
- FitzGerald GA, Patrono C (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345(6):433–442. <https://doi.org/10.1056/NEJM200108093450607>.
- Gan TJ (2010) Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin* 26(7):1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>.
- Gwanyanya A, Macianskiene R, Mubagwa K (2012) Insights into the effects of diclofenac and other non-steroidal anti-inflammatory agents on ion channels. *J Pharm Pharmacol* 64(10):1359–1375. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01479.x>.
- Hamza M, Dionne RA (2009) Mechanisms of non-opioid analgesics beyond cyclooxygenase enzyme inhibition. *Curr Mol Pharmacol* 2(1):1–14. <https://doi.org/10.2174/1874467210902010001>.
- Håring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnberg P, La Manno G, Sharma N, et al. (2018) Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* 21(6):869–880. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0141-1>.
- Hedo G, Laird JM, Lopez-Garcia JA (1999) Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience* 92(1):309–318. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00734-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00734-9).
- Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61(2):169–203. DOI: S0301-0082(99)00051-9.
- Hirano K, Kuratani K, Fujiyoshi M, Tashiro N, Hayashi E, Kinoshita M (2007) $K_v7.2-7.5$ voltage-gated potassium channel (KCNQ2-5) opener, retigabine, reduces capsaicin-induced visceral pain in mice. *Neurosci Lett* 413(2):159–162. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.043>.
- Huang CW, Hung TY, Liao YK, Hsu MC, Wu SN (2013) Underlying mechanism of regulatory actions of diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent, on neuronal potassium channels and firing: an experimental and theoretical study. *J Physiol Pharmacol* 64(3):269–280.
- Jentsch TJ (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1(1):21–30. <https://doi.org/10.1038/35036198>.
- King CH, Scherer SS (2012) $K_v7.5$ is the primary K_v7 subunit expressed in C-fibers. *J Comp Neurol* 520(9):1940–1950. <https://doi.org/10.1002/cne.23019>.
- Klinger F, Geier P, Dorostkar MM, Chandaka GK, Yousuf A, Salzer I, Kubista H, Boehm S (2012) Concomitant facilitation of GABAA receptors and K_v7 channels by the non-opioid analgesic flupirtine. *Br J Pharmacol* 166(5):1631–1642. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01821.x>.
- Labro AJ, Priest MF, Lacroix JJ, Snyders DJ, Bezanilla F (2015) $K_v3.1$ uses a timely resurgent $K(+)$ current to secure action potential repolarization. *Nat Commun* 6:10173. <https://doi.org/10.1038/ncomms10173>.

- Lee HM, Kim HI, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH (2003) Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 992(1):120–127. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.048>.
- Linley JE, Pettinger L, Huang D, Gamper N (2012) M channel enhancers and physiological M channel block. *J Physiol* 590(4):793–807. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.223404>.
- Lizarraga I, Chambers JP, Johnson CB (2006) Depression of NMDA-receptor-mediated segmental transmission by ketamine and ketoprofen, but not L-NAME, on the in vitro neonatal rat spinal cord preparation. *Brain Res* 1094(1):57–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.117>.
- Lopez-Garcia JA, Laird JM (1998) Central antinociceptive effects of meloxicam on rat spinal cord in vitro. *NeuroReport* 9(4):647–651. <https://doi.org/10.1097/00001756-199803090-00016>.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1992) Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263(1):136–146.
- Martinez-Gomez J, Lopez-Garcia JA (2005) Electrophysiological and pharmacological characterisation of ascending anterolateral axons in the in vitro mouse spinal cord. *J Neurosci Methods* 146(1):84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.01.015>.
- Martire M, Castaldo P, D'Amico M, Preziosi P, Annunziato L, Tagliatalata M (2004) M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *J Neurosci* 24(3):592–597. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3143-03.2004>.
- Mazo I, Roza C, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, Lopez-Garcia JA (2015) Effects of centrally acting analgesics on spinal segmental reflexes and wind-up. *Eur J Pain* 19(7):1012–1020. <https://doi.org/10.1002/ejp.629>.
- Mi Y, Zhang X, Zhang F, Qi J, Gao H, Huang D, Li L, Zhang H, et al. (2013) The role of potassium channel activation in celecoxib-induced analgesic action. *PLoS ONE* 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054797> e54797.
- Narai Y, Imamachi N, Saito Y (2012) Gabapentin augments the antihyperalgesic effects of diclofenac sodium through spinal action in a rat postoperative pain model. *Anesth Analg* 115(1):189–193. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31824e5da3>.
- Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al-Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, et al. (2003) KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 23(18):7227–7236. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-18-07227.2003>.
- Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B (2005) Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67(4):1053–1066. <https://doi.org/10.1124/mol.104.007112>.
- Rivera-Arconada I, Lopez-Garcia JA (2005) Effects of M-current modulators on the excitability of immature rat spinal sensory and motor neurones. *Eur J Neurosci* 22(12):3091–3098. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04507.x>.
- Rivera-Arconada I, Martinez-Gomez J, Lopez-Garcia JA (2004) M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* 46(4):598–606. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.10.016>.
- Rivera-Arconada I, Roza C, Lopez-Garcia JA (2009) Enhancing m currents: a way out for neuropathic pain? *Front Mol Neurosci* 210. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.010.2009>.
- Roza C, Mazo I, Rivera-Arconada I, Cisneros E, Alayón I, López-García J (2016) Analysis of spontaneous activity of superficial dorsal horn neurons in vitro: neuropathy-induced changes. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 468(11):2017–2030. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1886-6>.
- Santos AR, Vedana EM, De Freitas GA (1998) Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm Res* 47(7):302–307. <https://doi.org/10.1007/s000110050333>.
- Sathyamurthy A, Johnson KR, Matson KJE, Dobrott CI, Li L, Ryba AR, Bergman TB, Kelly MC, et al. (2018) Massively parallel single nucleus transcriptional profiling defines spinal cord neurons and their activity during behavior. *Cell Reports* 22(8):2216–2225. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.003>.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, et al. (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18(1):25–29. <https://doi.org/10.1038/ng0198-25>.
- Szelenyi I (2013) Flupirtine, a re-discovered drug, revisited. *Inflamm Res* 62(3):251–258. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0592-5>.
- Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, Rivera-Arconada I (2016) Effects of novel subtype selective M-current activators on spinal reflexes in vitro: comparison with retigabine. *Neuropharmacology* 109131–138. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.025>.
- Vicente-Baz J, Lopez-Garcia JA, Rivera-Arconada I (2019) Implication of Kv7 channels in the spinal antinociceptive actions of celecoxib. *J Pharmacol Exp Ther* 370(3):472–479. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258053>.
- Willis JV, Kendall MJ, Flinn RM, Thornhill DP, Welling PG (1979) The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 16(6):405–410. <https://doi.org/10.1007/bf00568201>.
- Wu S, Hsu M, Liao Y, Wu F, Jong Y, Lo Y (2012) Evidence for inhibitory effects of flupirtine, a centrally acting analgesic, on delayed rectifier k(+) currents in motor neuron-like cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012148403. <https://doi.org/10.1155/2012/148403>.
- Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC (2001) The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci* 21(16):5847–5853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-05847.2001>.
- Yarishkin OV, Hwang EM, Kim D, Yoo JC, Kang SS, Kim DR, Shin JH, Chung HJ, et al. (2009) Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, inhibits L-type Ca channels in neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *Korean J Physiol Pharmacol* 13(6):437–442. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2009.13.6.437>.
- Yeung S, Schwake M, Pucovsky V, Greenwood I (2008) Bimodal effects of the Kv7 channel activator retigabine on vascular K+ currents. *Br J Pharmacol* 155(1):62–72. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.231>.
- Yoshino T, Kimoto A, Kobayashi S, Noguchi M, Fukunaga M, Hayashi A, Miyata K, Sasamata M (2005) Pharmacological profile of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Arzneimittelforschung* 55(7):394–402. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296878>.
- Zaczek R, Chorvat RJ, Saye JA, Pierdomenico ME, Maciag CM, Logue AR, Fisher BN, Rominger DH, et al. (1998) Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: comparison to linopirdine. *J Pharmacol Exp Ther* 285(2):724–730.

(Received 29 January 2020, Accepted 28 May 2020)
(Available online 5 June 2020)

Discusión general



El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la implicación de los canales K_v7 neuronales en la transmisión nociceptiva espinal y su posible validación como diana farmacológica en dolor. Para ello, se han realizado estudios electrofisiológicos y farmacológicos en preparaciones de médula espinal de ratones neonatos mantenidas *in vitro*. Se han evaluado los efectos de nuevos facilitadores de los canales K_v7 , como son ICA-069673 y ML213, y de los antiinflamatorios diclofenaco y celecoxib en la transmisión nociceptiva espinal. Todos los compuestos estudiados deprimieron significativamente los reflejos espinales nociceptivos con un perfil de acción similar a otros fármacos analgésicos (Mazo y cols, 2015), afectando preferentemente a la sumación y el *wind-up*, que son procesos que implican neuronas nociceptivas (Herrero y cols, 2000). El bloqueo previo de los canales K_v7 con XE-991 sugiere que el principal mecanismo de acción de estos compuestos en la médula espinal es la activación de estos canales.

Acciones de nuevos facilitadores de los canales K_v7

Retigabina y flupirtina son excelentes herramientas farmacológicas que han permitido estudiar y comprender la fisiología y fisiopatología de los canales K_v7 . Sin embargo, tanto retigabina como flupirtina no son selectivos sobre subunidades concretas de los canales K_v7 y muestran efectos inespecíficos sobre otras dianas (Klinger y cols, 2012; Rundfeldt y Netzer, 2000; van Rijn y Willems-van Bree, 2003). Si bien fueron aprobados para uso en clínica, los efectos adversos que producen, que incluyen retención urinaria, pigmentación retiniana o lesiones hepáticas graves, supusieron la retirada del mercado de ambos fármacos.

A pesar de esto, retigabina y flupirtina siguen siendo compuestos de gran interés por sus potenciales propiedades terapéuticas y sirven como punto de partida para el desarrollo de nuevos moduladores de los canales K_v7 . En los últimos años, se han dedicado numerosos esfuerzos en sintetizar facilitadores más potentes y selectivos a partir de las estructuras de retigabina y flupirtina, que puedan servir para futuros tratamientos eficaces y seguros (Dalby-Brown y cols, 2013; Ostacolo y cols, 2020; Surur y cols, 2019).

Además de los análogos de retigabina y flupirtina, se han diseñado otros facilitadores de canales K_v7 , entre los que se incluye el compuesto **ML213**. En la médula espinal, ML213 ($EC_{50} = 0,2 \mu M$) demostró ser un compuesto más potente que retigabina ($EC_{50} = 2 \mu M$) reduciendo las respuestas a la estimulación repetida de la raíz dorsal de alta intensidad. Yu y colaboradores (2011) ya demostraron que ML213 es un potente activador de los canales K_v7 . En cuanto a su selectividad por las diferentes subunidades, se describió que presenta efectos sobre las subunidades $K_v7.2$ ($EC_{50} = 0,23 \mu M$) y $K_v7.4$ ($EC_{50} = 0,5 \mu M$), aunque activa los canales heteroméricos $K_v7.2/3$ de manera similar a los canales homoméricos $K_v7.2$ (Kanyo y cols, 2020; Yu y cols, 2011). Por su parte, Brueggemann y colaboradores (2014) comprobaron que ML213 también es capaz de activar canales homoméricos $K_v7.5$ y canales heteroméricos $K_v7.4/5$ con una potencia similar. Además, el residuo de triptófano fundamental para la unión de retigabina también resulta esencial para la unión de ML213 (Brueggemann y cols, 2014; Jepps y cols, 2014; Kanyo y cols, 2020). Por lo que ML213 es un facilitador de canales K_v7 que muestra un mecanismo de acción similar a retigabina, pero con una potencia mayor.

Los resultados de esta Tesis Doctoral también indican que ML213 es más específico sobre los canales K_v7 que retigabina. El bloqueo de estos canales con XE-991 abole los efectos de ML213 a la concentración máxima utilizada (10 μM), pero no los de retigabina (30 μM). Resultados similares se obtuvieron en células musculares. ML213 hiperpolariza (Choi y cols, 2021; Jepps y cols, 2014; Provence y cols, 2018) y aumenta la amplitud de corriente (Brueggemann y cols, 2014; Choi y cols, 2021) en varios tipos de células de músculo liso. Estos efectos se inhiben completamente cuando se bloquean los canales K_v7 con XE-991 (Choi y cols, 2021; Provence y cols, 2018), indicando la especificidad de ML213 por estos canales. Estos datos indican que ML213 es un activador potente y específico sobre los canales K_v7 , pero no es selectivo sobre subunidades concretas.

Los efectos antinociceptivos que produce ML213 en la médula espinal, similares a retigabina, junto con la capacidad analgésica que muestra retigabina en varios modelos animales (ver introducción), sugieren que ML213 también podría mostrar capacidad analgésica. ML213 es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica y acceder al SNC cuando se aplica vía intraperitoneal, sin embargo, los datos de estabilidad metabólica indican una rápida eliminación en su aplicación sistémica, por lo que probablemente ML213 no sería apropiado para la administración oral (Yu y cols, 2011).

Otra línea de trabajo en el desarrollo de nuevos moduladores de los canales K_v7 ha sido la búsqueda de moléculas con actividad preferencial sobre los canales $K_v7.2/3$, la configuración con niveles de expresión más elevados en el SNC (Cooper y cols, 2000; Wang y cols, 1998). En concreto, la compañía ICAGEN ha desarrollado varios compuestos a partir de una estructura química novedosa, entre los que se encuentran ICA-27243 e **ICA-069673** (Amato y cols, 2011; Wickenden y cols, 2008). En esta Tesis Doctoral hemos utilizado ICA-069673 porque forma parte de la segunda generación de estos compuestos y se encuentra disponible comercialmente. En nuestras condiciones, ICA-069673 deprimió los reflejos nociceptivos espinales con una potencia similar a retigabina ($EC_{50} = 2,6 \mu\text{M}$). Al igual que ocurre con ML213, los efectos depresores de ICA-069673 a la concentración máxima utilizada (30 μM) fueron abolidos con la aplicación previa de XE-991. Por lo que también muestra una especificidad mayor por los canales K_v7 respecto a retigabina.

Originalmente, en ensayos de flujo de rubidio, ICA-069673 se mostró 20 veces más selectivo sobre los canales $K_v7.2/3$ ($EC_{50} = 0,7 \mu\text{M}$) respecto a los canales $K_v7.3/5$ ($EC_{50} = 14,3 \mu\text{M}$), aunque también bloquea los canales $K_v7.1$ con una IC_{50} de 100 μM (Amato y cols, 2011). Trabajos más recientes con procedimientos electrofisiológicos han demostrado que ICA-069673 es en realidad un potente activador de la subunidad $K_v7.2$, sin apenas efecto sobre la subunidad $K_v7.3$ y con efectos intermedios sobre canales $K_v7.2/3$ (Kanyo y cols, 2020; Wang y cols, 2017; Wang y cols, 2018). Por lo que se trata de un compuesto más selectivo por subunidades concretas de canales K_v7 respecto a retigabina y ML213. Las similitudes en los efectos de ICA-069673, ML213 y retigabina en la médula espinal sugieren que gran parte de la actividad antinociceptiva observada podría deberse a la activación de los canales $K_v7.2$ y $K_v7.2/3$.

ICA-069673 superó los estudios de biodisponibilidad y toxicidad en modelos animales de epilepsia (Amato y cols, 2011). De momento no hay trabajos que hayan estudiado la actividad analgésica de ICA-069673 *in vivo*, pero los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que tiene efectos antinociceptivos *in vitro* similares a otros compuestos analgésicos. El compuesto

ICA-27243, de estructura similar a ICA-069673, es un potente facilitador de canales $K_v7.2$ y $K_v7.2/3$ (Blom y cols, 2010; Wickenden y cols, 2008) y muestra efectos analgésicos en modelos animales. ICA-27243 reduce la hiperalgesia y la alodinia en el modelo neuropático de ligadura de nervio espinal, además de la hiperalgesia térmica en el modelo inflamatorio inducido por carragenina (Wickenden y McNaughton-Smith, 2009). Por otro lado, Hayashi y colaboradores (2014) compararon los efectos de ICA-27273 y retigabina en varios modelos de dolor. La administración oral de ambos compuestos reduce la hiperalgesia térmica en el modelo de CFA con un efecto dependiente de la dosis. Efectos similares se observan con la administración intraplantar en el modelo de formalina. Estas similitudes en la actividad de ICA-27243 y retigabina sugieren que gran parte de la eficacia analgésica observada en modelos de dolor se debe a la activación de los canales $K_v7.2$ y $K_v7.2/3$. Además, estos datos refuerzan la idea de que ICA-069673 también podría mostrar cierta capacidad analgésica, dado que ambos compuestos tienen mecanismos de acción similares (Padilla y cols, 2009; Wang y cols, 2017).

Mecanismos de acción molecular de los facilitadores de canales K_v7

En la médula espinal, ICA-069673 muestra una acción depresora progresiva sobre los reflejos espinales nociceptivos, con muy poco efecto en las primeras respuestas del tren de estímulos y con un efecto mucho mayor sobre los estímulos posteriores. En cambio, retigabina y ML213 disminuyen estas respuestas desde el inicio del tren de estímulos. Estos resultados demuestran que ICA-069673 tiene un mecanismo de acción diferente que parece que es dependiente de actividad.

El progreso de los últimos años en el desarrollo de nuevos facilitadores de los canales K_v7 establece una clara distinción entre al menos dos tipos de compuestos atendiendo a su mecanismo de acción. Moduladores que se unen al poro del canal y moduladores que interactúan con el dominio sensor de voltaje. El compuesto de referencia de la primera categoría es retigabina, que se une al dominio de poro de los canales K_v7 neuronales ($K_v7.2-5$) y requiere un solo sitio de unión para su eficacia máxima (Yau y cols, 2018). Una característica funcional de los compuestos que se unen al poro, entre los que también se incluye ML213, es que exhiben una activación acelerada del canal junto con una desactivación desacelerada.

Mediante estudios de mutagénesis dirigida y la utilización de quimeras se han revelado algunos de los residuos que son fundamentales para la interacción de retigabina con los canales K_v7 . El residuo de triptófano Trp236 de la subunidad $K_v7.2$ (Trp265 en la subunidad $K_v7.3$), localizado en la región citoplasmática del segmento S5, es el primer aminoácido que se describió como fundamental para la activación de los canales K_v7 por retigabina (Schenzer y cols, 2005; Wuttke y cols, 2005). Este residuo también es fundamental para la unión de ML213 (Brueggemann y cols, 2014; Jepps y cols, 2014; Kanyo y cols, 2020). Además, determina la especificidad de retigabina por los canales K_v7 neuronales respecto a los canales cardiacos $K_v7.1$. Experimentos adicionales con la subunidad $K_v7.3$ demostraron que los aminoácidos leucina Leu272 (S5), Leu314 (región P) y Leu338 (S6), ausentes en la subunidad $K_v7.1$, también son importantes para la unión de retigabina (Lange y cols, 2009). Más recientemente, estudios de homología entre la

conformación abierta y cerrada del poro del canal $K_v7.3$ sugieren que las interacciones entre los residuos Trp265 (S5) y Phe343 (S6) son determinantes para la estabilización de la conformación cerrada. Retigabina desestabiliza esta interacción y favorece la conformación abierta del canal (Syeda y cols, 2016).

Por otro lado, varios moduladores de los canales K_v7 interactúan con el dominio sensor de voltaje del canal (Padilla y cols, 2009; Peretz y cols, 2007), entre los que se incluye ICA-069673 (Wang y cols, 2017). Los residuos A181 y F168, localizados en el segmento S3, resultan esenciales para la especificidad de este compuesto sobre la subunidad $K_v7.2$ (Wang y cols, 2017). Además, las mutaciones en estos residuos preservan la sensibilidad a retigabina y ML213 (Kanyo y cols, 2020) indicando que tienen lugares de unión diferentes.

ICA-069673 se une exclusivamente al estado activado del dominio sensor de voltaje y requiere de cuatro subunidades sensibles para lograr una eficacia máxima (Wang y cols, 2018). En contraste, retigabina y ML213 pueden acceder más fácilmente a los estados de reposo del canal (Kanyo y cols, 2020; Wang y cols, 2018). Por lo tanto, cuando los canales $K_v7.2$ se encuentran en reposo, ICA-069673 tiene una capacidad de unión reducida y la cinética de activación es comparable a las condiciones control. Sin embargo, cuando una despolarización activa el sensor de voltaje de estos canales, ICA-069673 se une fácilmente, manteniendo la conformación abierta del canal durante un periodo prolongado. Estos datos pueden explicar las diferencias que muestra ICA-069673 respecto a retigabina y ML213 en la inhibición de la transmisión nociceptiva espinal.

Acciones de otros analgésicos sobre los canales K_v7

Se ha demostrado que algunos analgésicos de uso común también son capaces de modular los canales K_v7 , como es el caso de **celecoxib**. Celecoxib es un inhibidor selectivo de la isoforma dos de la ciclooxigenasa (COX-2), una enzima responsable de la producción de moléculas inflamatorias (Penning y cols, 1997). Sin embargo, varios trabajos han demostrado que celecoxib inhibe los canales $K_v7.1$ (IC_{50} entre 3,5-4 μM) y activa los canales neuronales $K_v7.2-4$, $K_v7.2/3$ y $K_v7.3/5$ (EC_{50} entre 2-5 μM) de forma similar a retigabina (Brueggemann y cols, 2011; Du y cols, 2011; Frolov y cols, 2011; Mi y cols, 2013). Mutaciones en el residuo Trp236 del canal $K_v7.2$ reducen los efectos de celecoxib (Du y cols, 2011), por lo que parece que interactúa con el dominio de poro.

En la médula espinal de ratones sometidos a una inflamación periférica, celecoxib deprimió los reflejos espinales nociceptivos y las respuestas de neuronas del asta dorsal a la estimulación de fibras C. Estos efectos ocurren a concentraciones terapéuticas relevantes ($\geq 3 \mu M$), ya que la concentración plasmática de celecoxib en las dosis habituales utilizadas en clínica es de alrededor de 1-4 μM (Davies y cols, 2000). Los efectos depresores de celecoxib a todas las concentraciones utilizadas fueron abolidos cuando se bloquearon los canales K_v7 previamente con XE-991, lo que indica una actuación específica sobre estos canales.

En las condiciones testadas, la modulación de los canales K_v7 por parte de celecoxib parece que es independiente de la inhibición de COX. El compuesto dimetil-celecoxib, derivado de celecoxib, disminuyó la transmisión nociceptiva espinal de manera similar a celecoxib. Dimetil-celecoxib,

no inhibe la actividad de COX-2 (Kardosh y cols, 2005), pero tiene un efecto similar a celecoxib sobre los canales $K_v7.2$ (Du y cols, 2011). Además, indometacina, otro inhibidor de COX que no presenta acciones sobre los canales K_v7 , no mostró ningún efecto depresor significativo sobre los reflejos espinales nociceptivos, mientras que la aplicación adicional de celecoxib produjo claras acciones depresoras.

Celecoxib y dimetil-celecoxib reducen de manera similar la corriente M nativa en neuronas de ganglio de la raíz dorsal de pequeño tamaño. Ambos compuestos atenúan el comportamiento nociceptivo inducido en un modelo inflamatorio con bradicinina y en un modelo de neuropatía (Mi y cols, 2013). Además, la aplicación intratecal de celecoxib muestra efectos analgésicos en diferentes modelos animales de dolor (Lee y Seo, 2008; Nishiyama, 2006), lo que sugiere que la activación de los canales K_v7 podría contribuir a la acción analgésica de celecoxib también a nivel de la médula espinal. En conjunto, estos resultados sugieren que la acción antinociceptiva de celecoxib en la médula espinal *in vitro* tras un proceso inflamatorio ya establecido, parece que se debe principalmente a la activación de los canales K_v7 y no a la inhibición de COX.

Diclofenaco es otro analgésico de uso común que también es capaz de modular los canales K_v7 . El mecanismo de acción principal de este fármaco es la inhibición de las COXs, reduciendo así la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, Peretz y colaboradores (2005) demostraron que diclofenaco aumenta la corriente de los canales $K_v7.2/7.3$ ($EC_{50} = 2,6 \mu M$). Posteriormente, Brueggemann y colaboradores (2011) demostraron que diclofenaco es capaz de bloquear los canales $K_v7.5$ ($IC_{50} = 20 \mu M$). Además, diclofenaco aumenta la corriente M nativa en neuronas del tálamo implicadas en la transmisión de información nociceptiva, mientras que el bloqueo previo de los canales K_v7 con XE-991 evita estos efectos (Cerina y cols, 2015). En cambio, aunque diclofenaco también reduce la excitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales, parece que este efecto se produce mediante mecanismos que no dependen de los canales K_v7 (Paz y cols, 2018). Estos trabajos sugieren que diclofenaco reduce la excitabilidad de neuronas del SNC mediante la activación de los canales K_v7 , pero también a través de otros mecanismos.

Para evaluar los efectos de diclofenaco en la médula espinal se realizaron estudios comparativos con el analgésico flupirtina, un facilitador de canales K_v7 que no presenta acciones sobre COX. Ambos fármacos inhibieron la transmisión nociceptiva espinal. Los efectos de diclofenaco se produjeron a concentraciones cercanas ($\geq 10 \mu M$) a las concentraciones plasmáticas que se alcanzan en humanos con las dosis que generalmente se utilizan en clínica (en torno a $6 \mu M$) (Crook y cols, 1982). El bloqueo previo de los canales K_v7 con XE-991 redujo significativamente las acciones depresoras de diclofenaco y flupirtina, aunque no las abolió completamente. Estos resultados indican la implicación de los canales K_v7 en los efectos observados, pero también la existencia de otros mecanismos adicionales.

Sin embargo, diclofenaco y flupirtina mostraron efectos diferentes en los parámetros analizados en las respuestas a la estimulación repetida de alta intensidad. Ambos fármacos produjeron una depresión clara del *wind-up*, pero diclofenaco no tuvo un efecto tan potente como flupirtina sobre el área de despolarización acumulada de las motoneuronas. El área de despolarización podría depender en mayor medida de las neuronas del asta dorsal y los cambios en la excitabilidad de estas neuronas se reflejan principalmente en este parámetro.

Para estudiar los efectos de diclofenaco en los circuitos sensoriales se realizaron registros de neuronas del asta dorsal. Mientras que flupirtina produjo una reducción potente en la respuesta a la estimulación de aferentes nociceptivas, diclofenaco no mostró efectos significativos a ninguna de las concentraciones utilizadas. Estas diferencias se pueden explicar por una expresión diferencial de subunidades de los canales K_v7 entre las neuronas del asta dorsal y las motoneuronas. En concreto la subunidad $K_v7.5$ podría tener un papel relevante. Flupirtina activa de manera similar todas las subunidades de canales K_v7 neuronales (Klinger y cols, 2012), en cambio, aunque diclofenaco actúa como facilitador de canales $K_v7.2/3$ (Peretz y cols, 2005), también es capaz de inhibir los canales $K_v7.5$ (Brueggemann y cols, 2011). Teniendo en cuenta que la subunidad $K_v7.5$ se expresa en nociceptores (King y Scherer, 2012) y posiblemente en las neuronas del asta dorsal (Häring y cols, 2018; Rivera-Arconada y cols, 2009; Sathyamurthy y cols, 2018), es esperable que diclofenaco muestre efectos depresores menores en estas neuronas.

En cuanto al mecanismo de acción de diclofenaco, se sabe que no actúa sobre el residuo de triptófano Trp236 de los canales $K_v7.2$ (Miceli y cols, 2008). Por el momento no se han realizado estudios para determinar si se une al poro o al sensor de voltaje de los canales K_v7 . No obstante, el bloqueo de los canales $K_v7.5$ por diclofenaco es dependiente de voltaje, siendo este bloqueo mayor a potenciales más positivos (Brueggemann y cols, 2011). Esta dependencia de voltaje sugiere que diclofenaco podría interaccionar con el sensor de voltaje más que con el poro de estos canales.

En resumen, en las condiciones estudiadas en esta Tesis Doctoral, ICA-069673 y ML213 mostraron una especificidad mayor por los canales K_v7 que los facilitadores clásicos retigabina y flupirtina. Además, ML213 y celecoxib inhibieron las respuestas de las neuronas del asta dorsal tras la estimulación de aferentes nociceptivas, lo que indica una acción directa sobre las neuronas sensoriales. En cambio, diclofenaco no tuvo un efecto significativo en las neuronas del asta dorsal. Teniendo en cuenta que los moduladores utilizados muestran sensibilidades diferentes sobre las distintas subunidades de los canales K_v7 , estos resultados sugieren que podría haber diferencias en cuanto a la expresión de subunidades concretas de estos canales entre áreas sensoriales y motoras de la médula espinal. En conjunto, estos resultados demuestran el importante papel que tienen los canales K_v7 en la transmisión nociceptiva y refuerzan la utilidad de estos canales como diana farmacológica en la investigación y el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento del dolor.

Conclusiones



Conclusiones

- I. Los nuevos moduladores de canales K_v7 , ICA-069673 y ML213, han mostrado un efecto antinociceptivo similar a retigabina y flupirtina, pero con una especificidad mayor por estos canales. Teniendo en cuenta el potencial analgésico que muestran los facilitadores clásicos, el diseño de moduladores más específicos y selectivos de subunidades concretas de canales K_v7 puede ser una estrategia importante en el desarrollo de fármacos con actividad analgésica.
- II. El efecto analgésico de los antiinflamatorios celecoxib y diclofenaco podría deberse en parte a la activación de los canales K_v7 . El diseño de derivados de analgésicos que mantengan la capacidad de modular los canales K_v7 , pero que carezcan de actividad sobre otras dianas, podría ser una metodología relevante en el desarrollo de fármacos que modulen positivamente estos canales.
- III. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral refuerzan la importancia que tienen los canales de potasio K_v7 en el control de la excitabilidad de las neuronas implicadas en la transmisión de información nociceptiva. La actuación farmacológica con facilitadores de los canales K_v7 podría representar una estrategia interesante para el tratamiento de diversas patologías que cursan de dolor crónico.

Referencias bibliográficas



- Abd-Elseyed AA, Ikeda R, Jia Z, Ling J, Zuo X, Li M, Gu JG (2015). KCNQ channels in nociceptive cold-sensing trigeminal ganglion neurons as therapeutic targets for treating orofacial cold hyperalgesia. *Mol Pain* 11
- Abraira VE, Ginty DD (2013). The sensory neurons of touch. *Neuron* 79: 618-639.
- Abraira VE, Kuehn ED, Chirila AM, Springel MW, Toliver AA, Zimmerman AL, Orefice LL, Boyle KA, Bai L, Song BJ, Bashista KA, O'Neill TG, Zhuo J, Tsan C, Hoynoski J, Rutlin M, Kus L, Niederkofler V, Watanabe M, Dymecki SM, Nelson SB, Heintz N, Hughes DI, Ginty DD (2017). The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168: 295-310.
- Adams PR, Brown DA, Constanti A (1982). Pharmacological inhibition of the M-current. *J Physiol* 332: 223-262.
- Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM (2005). Accessory Kvbeta1 subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K⁺ channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 96: 451-458.
- Al Ghamdi KS, Polgár E, Todd AJ (2009). Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin 1 receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn. *Neuroscience* 164: 1794-1804.
- Alaburda A, Perrier J, Hounsgaard J (2002). An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol* 540: 875-881.
- Alba-Delgado C, El Khoueiry C, Peirs C, Dallel R, Artola A, Antri M (2015). Subpopulations of PKC γ interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* 156: 1714-1728.
- Almarestani L, Waters SM, Krause JE, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A (2007). Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 504: 287-297.
- Amato G, Roeloffs R, Rigdon GC, Antonio B, Mersch T, McNaughton-Smith G, Wickenden AD, Fritch P, Suto MJ (2011). N-Pyridyl and Pyrimidine Benzamides as KCNQ2/Q3 Potassium Channel Openers for the Treatment of Epilepsy. *ACS Med Chem Lett.* 2: 481-484.
- Armstrong CM and Bezanilla F (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242: 459-461.
- Bal M, Zhang J, Zaika O, Hernandez CC, Shapiro MS (2008). Homomeric and heteromeric assembly of KCNQ (Kv7) K⁺ channels assayed by total internal reflection fluorescence/fluorescence resonance energy transfer and patch clamp analysis. *J Biol Chem* 283: 30668-30676.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384: 78-80.
- Barkai O, Puig S, Lev S, Title B, Katz B, Eli-Berchoer L, Gutstein HB, Binshtok AM (2019). Platelet-derived growth factor activates nociceptive neurons by inhibiting M-current and contributes to inflammatory pain. *Pain* 160: 1281-1296.

- Barrese V, Stott JB, Greenwood IA (2018). KCNQ-Encoded Potassium Channels as Therapeutic Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 58: 625-648.
- Baukrowitz T and Yellen G (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15: 951-960.
- Bernal L, Lopez-Garcia JA, Roza C (2016). Spontaneous activity in C-fibres after partial damage to the saphenous nerve in mice: Effects of retigabine. *Eur J Pain* 20: 1335-1345.
- Bernardo-Seisdedos G, Nuñez E, Gomis-Perez C, Malo C, Villarroel Á, Millet O (2018). Structural basis and energy landscape for the Ca²⁺ gating and calmodulation of the Kv7.2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 2395-2400.
- Bezanilla F (2002). Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 120: 465-473.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279: 403-406.
- Blackburn-Munro G and Jensen BS (2003). The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 460: 109-116.
- Blom SM, Schmitt N, Jensen HS (2010). Differential effects of ICA-27243 on cloned K(V)7 channels. *Pharmacology* 86: 174-181.
- Blunck R, Batulan Z (2012). Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol* 3.
- Bocksteins E, Raes AL, Van de Vijver G, Bruyns T, Van Bogaert P, Snyders DJ (2009). Kv2.1 and silent Kv subunits underlie the delayed rectifier K⁺ current in cultured small mouse DRG neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: 1271-1278.
- Bourane S, Grossmann KS, Britz O, Dalet A, Del Barrio MG, Stam FJ, Garcia-Campmany L, Koch S, Goulding M (2015). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160: 503-515.
- Boyle KA, Gradwell MA, Yasaka T, Dickie AC, Polgár E, Ganley RP, Orr DPH, Watanabe M, Abaira VE, Kuehn ED, Zimmerman AL, Ginty DD, Callister RJ, Graham BA, Hughes DI (2019). Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input: Implications for Tactile Allodynia. *Cell Rep* 28: 526-540.
- Boyle KA, Gutierrez-Mecinas M, Polgár E, Mooney N, O'Connor E, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2017). A quantitative study of neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord. *Neuroscience* 363: 120-133.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI (2014). Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82: 522-536.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10: 287-333.
- Breivik H, Eisenberg E, O'Brien T (2013). The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve

- knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health* 13.
- Brown DA, Adams PR (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283: 673-676.
- Brown DA, Passmore GM (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 156: 1185-1195.
- Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI (1995). Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J Comp Neurol* 356: 327-344.
- Brueggemann LI, Cribbs LL, Byron KL (2020). Structural Determinants of Kv7.5 Potassium Channels That Confer Changes in Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP2) Affinity and Signaling Sensitivities in Smooth Muscle Cells. *Mol Pharmacol* 97: 145-158.
- Brueggemann LI, Haick JM, Cribbs LL, Byron KL (2014). Differential activation of vascular smooth muscle Kv7.4, Kv7.5, and Kv7.4/7.5 channels by ML213 and ICA-069673. *Mol Pharmacol* 86: 330-341.
- Brueggemann LI, Mackie AR, Mani BK, Cribbs LL, Byron KL (2009). Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on vascular smooth muscle ion channels may account for differences in cardiovascular risk profiles. *Mol Pharmacol* 76: 1053-1061.
- Brueggemann LI, Mackie AR, Martin JL, Cribbs LL, Byron KL (2011). Diclofenac distinguishes among homomeric and heteromeric potassium channels composed of KCNQ4 and KCNQ5 subunits. *Mol Pharmacol* 79: 10-23.
- Bui TV, Akay T, Loubani O, Hnasko TS, Jessell TM, Brownstone RM (2013). Circuits for grasping: spinal dl3 interneurons mediate cutaneous control of motor behavior. *Neuron* 78: 191-204.
- Busserolles J, Tsantoulas C, Eschalier A, López García JA (2016). Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *Pain* 157: S7-S14.
- Cai J, Fang D, Liu X, Li S, Ren J, Xing G (2015). Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in the spinal cord contributes to the sensitization of dorsal horn WDR neurons and pain hypersensitivity in a rat model of bone cancer pain. *Oncol Rep* 33: 1540-1550.
- Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001). Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* 85: 1561-1574.
- Cao X, Byun H, Chen S, Cai Y, Pan H (2010). Reduction in voltage-gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 114: 1460-1475.
- Caramés MA, Navarro M (2017). Costes del tratamiento del dolor versus su no tratamiento. Aproximación a la realidad de Portugal y España. *Sociedad Española del Dolor* 24.
- Castaldo P, del Giudice EM, Coppola G, Pascotto A, Annunziato L, Tagliatalata M (2002). Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J Neurosci* 22.

- Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI, Anderson DJ (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9075-9080.
- Cerina M, Szkudlarek HJ, Coulon P, Meuth P, Kanyshkova T, Nguyen XV, Göbel K, Seidenbecher T, Meuth SG, Pape H, Budde T (2015). Thalamic Kv 7 channels: pharmacological properties and activity control during noxious signal processing. *Br J Pharmacol* 172: 3126-3140.
- Cervero F, Iggo A, Ogawa H (1976). Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain* 2: 5-24.
- Cervero F, Laird J (1991). One Pain or Many Pains? *Physiology* 6: 268-273.
- Chien L, Cheng J, Chu D, Cheng C, Tsaur M (2007). Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J Neurosci* 27: 9855-9865.
- Choi J, Han DH, Chae MR, Sung HH, Kang SJ, Shin J, Lee SW (2021). Molecular expression and functional features of Kv7 channels in human prostate smooth muscle. *Andrology*
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5092-5095.
- Choveau FS, De la Rosa V, Bierbower SM, Hernandez CC, Shapiro MS (2018). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) regulates KCNQ3 K⁺ channels by interacting with four cytoplasmic channel domains. *J Biol Chem* 293: 19411-19428.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP (1990). Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 4: 405-411.
- Chung HJ, Jan YN, Jan LY (2006). Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8870-8875.
- Cisneros E, Roza C, Jackson N, López-García JA (2015). A New Regulatory Mechanism for Kv7.2 Protein During Neuropathy: Enhanced Transport from the Soma to Axonal Terminals of Injured Sensory Neurons. *Front Cell Neurosci* 9.
- Constanti A, Brown DA (1981). M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neurosci Lett* 24: 289-294.
- Contet C, Goulding SP, Kuljis DA, Barth AL (2016). BK Channels in the Central Nervous System. *Int Rev Neurobiol* 128: 281-342.
- Cooper EC, Aldape KD, Abosch A, Barbaro NM, Berger MS, Peacock WS, Jan YN, Jan LY (2000). Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4914-4919.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 7: 763-773.

- Crook PR, Willis JV, Kendall MJ, Jack DB, Fowler PD (1982). The pharmacokinetics of diclofenac sodium in patients with active rheumatoid disease. *Eur J Clin Pharmacol* 21: 331-334.
- Crozier RA, Ajit SK, Kaftan EJ, Pausch MH (2007). MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. *J Neurosci* 27: 4492-4496.
- Cruzblanca H, Koh DS, Hille B (1998). Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7151-7156.
- Cui L, Miao X, Liang L, Abdus-Saboor I, Olson W, Fleming MS, Ma M, Tao Y, Luo W (2016). Identification of Early RET⁺ Deep Dorsal Spinal Cord Interneurons in Gating Pain. *Neuron* 91: 1137-1153.
- D'Adamo MC, Liantonio A, Rolland J, Pessia M, Imbrici P (2020). Kv1.1 Channelopathies: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 21.
- Dalby-Brown W, Jessen C, Hougaard C, Jensen ML, Jacobsen TA, Nielsen KS, Erichsen HK, Grunnet M, Ahring PK, Christophersen P, Strøbæk D, Jørgensen S (2013). Characterization of a novel high-potency positive modulator of K(v)7 channels. *Eur J Pharmacol* 709: 52-63.
- Daniluk J, Cooper JA, Stender M, Kowalczyk A (2016). Survey of Physicians' Understanding of Specific Risks Associated with Retigabine. *Drugs Real World Outcomes* 3: 155-163.
- Davidson S, Zhang X, Khasabov SG, Moser HR, Honda CN, Simone DA, Giesler GJ (2012). Pruriceptive spinothalamic tract neurons: physiological properties and projection targets in the primate. *J Neurophysiol* 108: 1711-1723.
- Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM (2000). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin.Pharmacokinet.* 38: 225-242.
- Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK (2001). Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12272-12277.
- Delmas P, Brown DA (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6: 850-862.
- Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, Mistry M, Brown DA (2002). Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* 34: 209-220.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24: 1236-1244.
- Devulder J (2010). Flupirtine in pain management: pharmacological properties and clinical use. *CNS Drugs* 24: 867-881.
- Dickie AC, Bell AM, Iwagaki N, Polgár E, Gutierrez-Mecinas M, Kelly R, Lyon H, Turnbull K, West SJ, Etlin A, Braz J, Watanabe M, Bennett DLH, Basbaum AI, Riddell JS, Todd AJ (2019). Morphological and functional properties distinguish the substance P and gastrin-releasing peptide subsets of excitatory interneuron in the spinal cord dorsal horn. *Pain* 160: 442-462.

- Djoughri L, Lawson SN (2004). Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 131-145.
- Djoughri L, Malki MI, Zeidan A, Nagi K, Smith T (2019). Activation of Kv7 channels with the anticonvulsant retigabine alleviates neuropathic pain behaviour in the streptozotocin rat model of diabetic neuropathy. *J Drug Target* 27: 1118-1126.
- Dodson PD, Billups B, Rusznák Z, Szûcs G, Barker MC, Forsythe ID (2003). Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J Physiol* 550: 27-33.
- Dost R, Rostock A, Rundfeldt C (2004). The anti-hyperalgesic activity of retigabine is mediated by KCNQ potassium channel activation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 369: 382-390.
- Douros A, Bronder E, Andersohn F, Klimpel A, Thomae M, Orzechowski H, Kreutz R, Garbe E (2014). Flupirtine-induced liver injury--seven cases from the Berlin Case-control Surveillance Study and review of the German spontaneous adverse drug reaction reporting database. *Eur J Clin Pharmacol* 70: 453-459.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- Du XN, Zhang X, Qi JL, An HL, Li JW, Wan YM, Fu Y, Gao HX, Gao ZB, Zhan Y, Zhang HL (2011). Characteristics and molecular basis of celecoxib modulation on K(v)7 potassium channels. *Br J Pharmacol* 164: 1722-1737.
- Duan B, Cheng L, Bourane S, Britz O, Padilla C, Garcia-Campmany L, Krashes M, Knowlton W, Velasquez T, Ren X, Ross S, Lowell BB, Wang Y, Goulding M, Ma Q (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 159: 1417-1432.
- Duan K, Xu Q, Zhang X, Zhao Z, Mei Y, Zhang Y (2012). Targeting A-type K(+) channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in a rat model. *Pain* 153: 562-574.
- Duflocq A, Chareyre F, Giovannini M, Couraud F, Davenne M (2011). Characterization of the axon initial segment (AIS) of motor neurons and identification of a para-AIS and a juxtapara-AIS, organized by protein 4.1B. *BMC Biol* 9.
- Emery EC, Luiz AP, Sikandar S, Magnúsdóttir R, Dong X, Wood JN (2016). In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv* 2: e1600990.
- Fan L, Guan X, Wang W, Zhao J, Zhang H, Tiwari V, Hoffman PN, Li M, Tao Y (2014). Impaired neuropathic pain and preserved acute pain in rats overexpressing voltage-gated potassium channel subunit Kv1.2 in primary afferent neurons. *Mol Pain* 10.
- Felten DL, Shetty AN, Netter FH (2010). Netter Atlas de Neurociencia. Saunders, Barcelona.
- Fidzinski P, Korotkova T, Heidenreich M, Maier N, Schuetze S, Kobler O, Zuschratter W, Schmitz D, Ponomarenko A, Jentsch TJ (2015). KCNQ5 K(+) channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. *Nat Commun* 6: 6254.

- Fowler PW and Sansom MSP (2013). The pore of voltage-gated potassium ion channels is strained when closed. *Nat Commun* 4: 1872.
- French JA, Abou-Khalil BW, Leroy RF, Yacubian EMT, Shin P, Hall S, Mansbach H, Nohria V (2011). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ezogabine (retigabine) in partial epilepsy. *Neurology* 76: 1555-1563.
- Frolov RV, Ignatova II, Singh S (2011). Inhibition of HERG potassium channels by celecoxib and its mechanism. *PLoS One* 6: e26344.
- Galvin VC, Yang ST, Paspalas CD, Yang Y, Jin LE, Datta D, Morozov YM, Lightbourne TC, Lowet AS, Rakic P, Arnsten AFT, Wang M (2020). Muscarinic M1 Receptors Modulate Working Memory Performance and Activity via KCNQ Potassium Channels in the Primate Prefrontal Cortex. *Neuron* 106: 649-661.
- Gamper N, Li Y, Shapiro MS (2005). Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol Biol Cell* 16: 3538-3551.
- Gamper N, Shapiro MS (2003). Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J Gen Physiol* 122: 17-31.
- Gao BX, Ziskind-Conhaim L (1998). Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 80: 3047-3061.
- García G, Noriega-Navarro R, Martínez-Rojas VA, Gutiérrez-Lara EJ, Oviedo N, Murbartían J (2019). Spinal TASK-1 and TASK-3 modulate inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 862: 1-10.
- Gobel S (1978). Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol* 180: 395-413.
- Goldstein SAN, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 527-540.
- González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R (2012). K⁺ channels: function-structural overview. *Compr Physiol* 2: 2087-2149.
- Grudt TJ, Perl ER (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540: 189-207.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 473-508.
- Han L, Ma C, Liu Q, Weng H, Cui Y, Tang Z, Kim Y, Nie H, Qu L, Patel KN, Li Z, McNeil B, He S, Guan Y, Xiao B, Lamotte RH, Dong X (2013). A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci* 16: 174-182.
- Han ZS, Zhang ET, Craig AD (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1: 218-225.

- Handwerker HO, Iggo A, Zimmermann M (1975). Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain* 1: 147-165.
- Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, La Manno G, Sharma N, Borgius L, Kiehn O, Lagerström MC, Linnarsson S, Ernfors P (2018). Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* 21: 869-880.
- Hayashi H, Iwata M, Tsuchimori N, Matsumoto T (2014). Activation of peripheral KCNQ channels attenuates inflammatory pain. *Mol Pain* 10.
- Heidenreich M, Lechner SG, Vardanyan V, Wetzel C, Cremers CW, De Leenheer EM, Aránguez G, Moreno-Pelayo MÁ, Jentsch TJ, Lewin GR (2011). KCNQ4 K(+) channels tune mechanoreceptors for normal touch sensation in mouse and man. *Nat Neurosci* 15: 138-145.
- Heinemann SH, Rettig J, Graack HR, Pongs O (1996). Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J Physiol* 493: 625-633.
- Heise C, Kayalioglu G (2009). Chapter 6 - Cytoarchitecture of the Spinal Cord. The Spinal Cord. Academic Press, San Diego.
- Hermansteyne TO, Kihira Y, Misono K, Deitchler A, Yanagawa Y, Misonou H (2010). Immunolocalization of the voltage-gated potassium channel Kv2.2 in GABAergic neurons in the basal forebrain of rats and mice. *J Comp Neurol* 518: 4298-4310.
- Hernandez CC, Falkenburger B, Shapiro MS (2009). Affinity for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determines muscarinic agonist sensitivity of Kv7 K+ channels. *J Gen Physiol* 134: 437-448.
- Hernandez CC, Zaika O, Shapiro MS (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K+ channels. *J Gen Physiol* 132: 361-381.
- Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA (2000). Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61: 169-203.
- Hodgkin AL and Huxley AF (1952). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116: 473-496.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250: 533-538.
- Hu H, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RW (2006). The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50: 89-100.
- Huang J, Polgár E, Solinski HJ, Mishra SK, Tseng P, Iwagaki N, Boyle KA, Dickie AC, Kriegbaum MC, Wildner H, Zeilhofer HU, Watanabe M, Riddell JS, Todd AJ, Hoon MA (2018). Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. *Nat Neurosci* 21: 707-716.
- Hughes DI, Todd AJ (2020). Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. *Neurotherapeutics* 17: 874-885.
- Ishikawa K, Tanaka M, Black JA, Waxman SG (1999). Changes in expression of voltage-

- gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve* 22: 502-507.
- Jentsch TJ (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1: 21-30.
- Jepps TA, Bentzen BH, Stott JB, Povstyan OV, Sivaloganathan K, Dalby-Brown W, Greenwood IA (2014). Vasorelaxant effects of novel Kv 7.4 channel enhancers ML213 and NS15370. *Br J Pharmacol* 171: 4413-4424.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 42-48.
- Kanyo R, Wang CK, Locskai LF, Li J, Allison WT, Kurata HT (2020). Functional and behavioral signatures of Kv7 activator drug subtypes. *Epilepsia* 61: 1678-1690.
- Kardosh A, Wang W, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen TC, Schönthal AH (2005). Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy* 4: 571.
- Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y, Yoshimura M (2006). Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *J Neurosci* 26: 1787-1794.
- Kayalioglu G (2009). Chapter 10 - Projections from the Spinal Cord to the Brain. *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego.
- Kharkovets T, Dedek K, Maier H, Schweizer M, Khimich D, Nouvian R, Vardanyan V, Leuwer R, Moser T, Jentsch TJ (2006). Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *EMBO J* 25: 642-652.
- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 105: 146-152.
- King CH, Scherer SS (2012). Kv7.5 is the primary Kv7 subunit expressed in C-fibers. *J.Comp.Neurol.* 520: 1940-1950.
- King CH, Lancaster E, Salomon D, Peles E, Scherer SS (2014). Kv7.2 regulates the function of peripheral sensory neurons. *J Comp Neurol* 522: 3262-3280.
- Klinger F, Geier P, Dorostkar MM, Chandaka GK, Yousuf A, Salzer I, Kubista H, Boehm S (2012). Concomitant facilitation of GABAA receptors and KV7 channels by the non-opioid analgesic flupirtine. *Br.J.Pharmacol.* 166: 1631-1642.
- Koch SC, Acton D, Goulding M (2018). Spinal Circuits for Touch, Pain, and Itch. *Annu Rev Physiol* 80: 189-217.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S (1998). Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392: 945-948.
- Kuang Q, Purhonen P, Hebert H (2015). Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci* 72: 3677-3693.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999). KCNQ4, a novel

potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96: 437-446.

Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 509-526.

Lamas JA, Selyanko AA, Brown DA (1997). Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (IK(M)) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9: 605-616.

Lang PM, Fleckenstein J, Passmore GM, Brown DA, Grafe P (2008). Retigabine reduces the excitability of unmyelinated peripheral human axons. *Neuropharmacology* 54: 1271-1278.

Lange W, Geissendörfer J, Schenzer A, Grötzinger J, Seeböhm G, Friedrich T, Schwake M (2009). Refinement of the binding site and mode of action of the anticonvulsant Retigabine on KCNQ K⁺ channels. *Mol Pharmacol* 75: 272-280.

Laumet G, Garriga J, Chen S, Zhang Y, Li D, Smith TM, Dong Y, Jelinek J, Cesaroni M, Issa J, Pan H (2015). G9a is essential for epigenetic silencing of K(+) channel genes in acute-to-chronic pain transition. *Nat Neurosci* 18: 1746-1755.

Lee O, Seo Y (2008). The effects of intrathecal cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, or nonselective inhibitors on pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. *Anesthesia and analgesia* 106: 972-977.

Lerche C, Scherer CR, Seeböhm G, Derst C, Wei AD, Busch AE, Steinmeyer K (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275: 22395-22400.

Li Y, Gamper N, Hilgemann DW, Shapiro MS (2005). Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25: 9825-9835.

Liang L, Gu X, Zhao J, Wu S, Miao X, Xiao J, Mo K, Zhang J, Lutz BM, Bekker A, Tao Y (2016). G9a participates in nerve injury-induced Kcna2 downregulation in primary sensory neurons. *Sci Rep* 6.

Lima D, Coimbra A (1986). A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 244: 53-71.

Ling J, Erol F, Gu JG (2018). Role of KCNQ2 channels in orofacial cold sensitivity: KCNQ2 upregulation in trigeminal ganglion neurons after infraorbital nerve chronic constrictive injury. *Neurosci Lett* 664: 84-90.

Linley JE, Ooi L, Pettinger L, Kirton H, Boyle JP, Peers C, Gamper N (2012). Reactive oxygen species are second messengers of neurokinin signaling in peripheral sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 1578.

Linley JE, Rose K, Patil M, Robertson B, Akopian AN, Gamper N (2008). Inhibition of M current in sensory neurons by exogenous proteases: a signaling pathway mediating inflammatory nociception. *J Neurosci* 28: 11240-11249.

Liu B, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, Gamper N (2010). The acute nociceptive

- signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest* 120: 1240-1252.
- Lombardo J, Harrington MA (2016). Nonreciprocal mechanisms in up- and downregulation of spinal motoneuron excitability by modulators of KCNQ/Kv7 channels. *J Neurophysiol* 116: 2114-2124.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005a). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897-903.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005b). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309: 903-908.
- Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450: 376-382.
- López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Recept Channels* 1: 61-71.
- Lu Y, Perl ER (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25: 3900-3907.
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun Y, Ji R, Xiong L (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest* 123: 4050-4062.
- Lyu C, Mulder J, Barde S, Sahlholm K, Zeberg H, Nilsson J, Århem P, Hökfelt T, Fried K, Shi TS (2015). G protein-gated inwardly rectifying potassium channel subunits 1 and 2 are down-regulated in rat dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Mol Pain* 11.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA (1997). Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278: 275-279.
- Marker CL, Luján R, Colón J, Wickman K (2006). Distinct populations of spinal cord lamina II interneurons expressing G-protein-gated potassium channels. *J Neurosci* 26: 12251-12259.
- Marshall GE, Shehab SA, Spike RC, Todd AJ (1996). Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience* 72: 255-263.
- Martire M, Castaldo P, D'Amico M, Preziosi P, Annunziato L, Tagliatela M (2004). M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *J Neurosci* 24: 592-597.
- Marvizón JCG, Chen W, Murphy N (2009). Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* 517: 51-68.
- Mazo I, Roza C, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, Lopez-Garcia JA (2015). Effects of centrally acting analgesics on spinal segmental reflexes and wind-up. *Eur.J.Pain* 19: 1012-1020.
- McGlone F, Wessberg J, Olausson H (2014). Discriminative and affective touch: sensing and feeling. *Neuron* 82: 737-755.

- Mi Y, Zhang X, Zhang F, Qi J, Gao H, Huang D, Li L, Zhang H, Du X (2013). The role of potassium channel activation in celecoxib-induced analgesic action. *PLoS One* 8: e54797.
- Miao X, Fan L, Wu S, Mao Q, Li Z, Lutz B, Xu J, Lu Z, Tao Y (2017). DNMT3a contributes to the development and maintenance of bone cancer pain by silencing Kv1.2 expression in spinal cord dorsal horn. *Mol Pain* 13: 1-14.
- Miceli F, Soldovieri MV, Martire M, Tagliatalata M (2008). Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr Opin Pharmacol* 8: 65-74.
- Miller C (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 1.
- Molander C, Xu Q, Grant G (1984). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230: 133-141.
- Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G (1989). Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J Comp Neurol* 289: 375-385.
- Mucha M, Ooi L, Linley JE, Mordaka P, Dalle C, Robertson B, Gamper N, Wood IC (2010). Transcriptional control of KCNQ channel genes and the regulation of neuronal excitability. *J Neurosci* 30: 13235-13245.
- Muqem T, Ghosh B, Pinto V, Lepore AC, Covarrubias M (2018). Regulation of Nociceptive Glutamatergic Signaling by Presynaptic Kv3.4 Channels in the Rat Spinal Dorsal Horn. *J Neurosci* 38: 3729-3740.
- Naim MM, Shehab SA, Todd AJ (1998). Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord which possess the neurokinin-1 receptor receive monosynaptic input from myelinated primary afferents. *Eur J Neurosci* 10: 3012-3019.
- Nappi P, Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Barrese V, Tagliatalata M (2020). Epileptic channelopathies caused by neuronal Kv7 (KCNQ) channel dysfunction. *Pflugers Arch* 472: 881-898.
- Nauta HJ, Hewitt E, Westlund KN, Willis WD (1997). Surgical interruption of a midline dorsal column visceral pain pathway. Case report and review of the literature. *J Neurosurg* 86: 538-542.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Fauré S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 15: 186-189.
- Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA, Mantyh PW (1999). Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 286: 1558-1561.
- Nishiyama T (2006). Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 50: 228-233.
- Oliva C, González V, Naranjo D (2005). Slow inactivation in voltage gated potassium channels is insensitive to the binding of pore occluding peptide toxins. *Biophys J* 89: 1009-1019.

- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010). Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120: 3779-3787.
- Ostacolo C, Miceli F, Di Sarno V, Nappi P, Iraci N, Soldovieri MV, Ciaglia T, Ambrosino P, Vestuto V, Lauritano A, Musella S, Pepe G, Basilicata MG, Manfra M, Perinelli DR, Novellino E, Bertamino A, Gomez-Monterrey IM, Campiglia P, Tagliatela M (2020). Synthesis and Pharmacological Characterization of Conformationally Restricted Retigabine Analogues as Novel Neuronal Kv7 Channel Activators. *J Med Chem* 63: 163-185.
- Otto JF, Kimball MM, Wilcox KS (2002). Effects of the anticonvulsant retigabine on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. *Mol.Pharmacol.* 61: 921-927.
- Padilla K, Wickenden AD, Gerlach AC, McCormack K (2009). The KCNQ2/3 selective channel opener ICA-27243 binds to a novel voltage-sensor domain site. *Neurosci Lett* 465: 138-142.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J.Neurosci.* 26: 2599-2613.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237: 749-753.
- Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, Mock AF, Huang Y, Wainstock DH (1995). Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel. *Neuron* 14: 1293-1301.
- Passmore GM, Reilly JM, Thakur M, Keasberry VN, Marsh SJ, Dickenson AH, Brown DA (2012). Functional significance of M-type potassium channels in nociceptive cutaneous sensory endings. *Front Mol Neurosci* 5:
- Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al-Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, Burbidge SA, Main M, Brown DA (2003). KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 23: 7227-7236.
- Paz RM, Tubert C, Stahl A, Díaz AL, Etchenique R, Murer MG, Rela L (2018). Inhibition of striatal cholinergic interneuron activity by the Kv7 opener retigabine and the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Neuropharmacology* 137: 309-321.
- Peirs C, Dallel R, Todd AJ (2020). Recent advances in our understanding of the organization of dorsal horn neuron populations and their contribution to cutaneous mechanical allodynia. *J Neural Transm* 127: 505-525.
- Peirs C, Williams SG, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, Goldring AC, Hioki H, Liu Z, Marell PS, Seal RP (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87: 797-812.
- Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, AndersonGD, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY, Isakson PC (1997). Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpiperazine class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-

methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene sulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 40: 1347-1365.

Perdigoto DN, Amaro P, Ferreira M, Tomé L (2018). Flupirtine drug-induced liver injury in a patient developing acute liver failure. *BMJ Case Rep* 2018.

Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B (2005). Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67: 1053-1066.

Peretz A, Degani-Katzav N, Talmon M, Danieli E, Gopin A, Malka E, Nachman R, Raz A, Shabat D, Attali B (2007). A tale of switched functions: from cyclooxygenase inhibition to M-channel modulation in new diphenylamine derivatives. *PLoS One* 2: e1332.

Petitjean H, Bourojeni FB, Tsao D, Davidova A, Sotocinal SG, Mogil JS, Kania A, Sharif-Naeini R (2019). Recruitment of Spinoparabrachial Neurons by Dorsal Horn Calretinin Neurons. *Cell Rep* 28: 1429-1438.

Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan L, Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep* 13: 1246-1257.

Polgár E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999). The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res* 833: 71-80.

Polgár E, Al-Khater KM, Shehab S, Watanabe M, Todd AJ (2008). Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J Neurosci* 28: 13150-13160.

Polgár E, Sardella TCP, Tiong SYX, Locke S, Watanabe M, Todd AJ (2013). Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* 154: 2606-2615.

Prescott SA and De Koninck Y (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol* 539: 817-836.

Provence A, Angoli D, Petkov GV (2018). KV7 Channel Pharmacological Activation by the Novel Activator ML213: Role for Heteromeric KV7.4/KV7.5 Channels in Guinea Pig Detrusor Smooth Muscle Function. *J Pharmacol Exp Ther* 364: 131-144.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Klanjn DS (2008). Neurociencia. Panamericana, Madrid.

Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song X, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 161: 1976-1982.

Ramon y Cajal S (1895). L'anatomie fine de la moëlle épinière. Atlas der pathologischen Histologie des Nervensystems.

- Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS (2001). Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13373-13378.
- Rasband MN and Trimmer JS (2001). Subunit composition and novel localization of K⁺ channels in spinal cord. *J Comp Neurol* 429: 166-176.
- Ray S, Salzer I, Kronschläger MT, Boehm S (2019). The paracetamol metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine reduces excitability in first- and second-order neurons of the pain pathway through actions on KV7 channels. *Pain* 160: 954-964.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O (1994). Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 369: 289-294.
- Rexed B (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96: 414-495.
- Rexed B (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 100: 297-379.
- Rivera-Arconada I and Lopez-Garcia JA (2006). Retigabine-induced population primary afferent hyperpolarisation in vitro. *Neuropharmacology* 51: 756-763.
- Rivera-Arconada I and Lopez-Garcia JA (2005). Effects of M-current modulators on the excitability of immature rat spinal sensory and motor neurones. *Eur J Neurosci* 22: 3091-3098.
- Rivera-Arconada I, Martinez-Gomez J, Lopez-Garcia JA (2004). M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* 46: 598-606.
- Rivera-Arconada I, Roza C, Lopez-Garcia JA (2009). Enhancing m currents: a way out for neuropathic pain? *Front Mol Neurosci* 2.
- Roeloffs R, Wickenden AD, Crean C, Werness S, McNaughton-Smith G, Stables J, McNamara JO, Ghodadra N, Rigdon GC (2008). In vivo profile of ICA-27243 [N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluorobenzamide], a potent and selective KCNQ2/Q3 (Kv7.2/Kv7.3) activator in rodent anticonvulsant models. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 818-828.
- Rose K, Ooi L, Dalle C, Robertson B, Wood IC, Gamper N (2011). Transcriptional repression of the M channel subunit Kv7.2 in chronic nerve injury. *Pain* 152: 742-754.
- Roza C, Castillejo S, Lopez-Garcia JA (2011). Accumulation of Kv7.2 channels in putative ectopic transduction zones of mice nerve-end neuromas. *Mol Pain* 7.
- Roza C, Lopez-Garcia JA (2008). Retigabine, the specific KCNQ channel opener, blocks ectopic discharges in axotomized sensory fibres. *Pain* 138: 537-545.
- Rundfeldt C (1997). The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells. *Eur J Pharmacol* 336: 243-249.
- Rundfeldt C, Netzer R (2000). Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. Interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung* 50: 1063-1070.

Sardella TCP, Polgár E, Garzillo F, Furuta T, Kaneko T, Watanabe M, Todd AJ (2011). Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn. *Mol Pain* 7.

Sathyamurthy A, Johnson KR, Matson KJE, Dobrott CI, Li L, Ryba AR, Bergman TB, Kelly MC, Kelley MW, Levine AJ (2018). Massively Parallel Single Nucleus Transcriptional Profiling Defines Spinal Cord Neurons and Their Activity during Behavior. *Cell Rep* 22: 2216-2225.

Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grotzinger J, Schwake M (2005). Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci*. 25: 5051-5060.

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15: 333-341.

Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275: 24089-24095.

Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T (2003). A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep* 4: 76-81.

Schwarz JR, Glassmeier G, Cooper EC, Kao TC, Nodera H, Tabuena D, Kaji R, Bostock H (2006). KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 573: 17-34.

Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH (2009). Injury-induced mechanical

hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462: 651-655.

Shah M, Mistry M, Marsh SJ, Brown DA, Delmas P (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 544: 29-37.

Shamgar L, Ma L, Schmitt N, Haitin Y, Peretz A, Wiener R, Hirsch J, Pongs O, Attali B (2006). Calmodulin is essential for cardiac IKs channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ Res* 98: 1055-1063.

Smith KM, Boyle KA, Madden JF, Dickinson SA, Jobling P, Callister RJ, Hughes DI, Graham BA (2015). Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J Physiol* 593: 4319-4339.

Smith KM, Browne TJ, Davis OC, Coyle A, Boyle KA, Watanabe M, Dickinson SA, Iredale JA, Gradwell MA, Jobling P, Callister RJ, Dayas CV, Hughes DI, Graham BA (2019). Calretinin positive neurons form an excitatory amplifier network in the spinal cord dorsal horn. *Elife* 8: e49190.

Soh H, Pant R, LoTurco JJ, Tzingounis AV (2014). Conditional deletions of epilepsy-associated KCNQ2 and KCNQ3 channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *J Neurosci* 34: 5311-5321.

Soh H, Tzingounis AV (2010). The specific slow afterhyperpolarization inhibitor UCL2077 is a subtype-selective blocker of the epilepsy associated KCNQ channels. *Mol Pharmacol* 78: 1088-1095.

Soldovieri MV, Miceli F, Tagliatela M (2011). Driving with no brakes: molecular

- pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology (Bethesda)* 26: 365-376.
- Splinter MY (2013). Efficacy of retigabine in adjunctive treatment of partial onset seizures in adults. *J Cent Nerv Syst Dis* 5: 31-41.
- Stefani E, Toro L, Perozo E, Bezanilla F (1994). Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys J* 66: 996-1010.
- Surur AS, Beirow K, Bock C, Schulig L, Kindermann MK, Boddke A, Siegmund W, Bednarski PJ, Link A (2019). Flupirtine Analogues: Explorative Synthesis and Influence of Chemical Structure on KV7.2/KV7.3 Channel Opening Activity. *ChemistryOpen* 8: 41-44.
- Syeda R, Santos JS, Montal M (2016). The Sensorless Pore Module of Voltage-gated K⁺ Channel Family 7 Embodies the Target Site for the Anticonvulsant Retigabine. *J Biol Chem* 291: 2931-2937.
- Tatulian L, Delmas P, Abogadie FC, Brown DA (2001). Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci* 21: 5535-5545.
- Teng B, Song Y, Zhang F, Ma T, Qi J, Zhang H, Li G, Wang K (2016). Activation of neuronal Kv7/KCNQ/M-channels by the opener QO58-lysine and its anti-nociceptive effects on inflammatory pain in rodents. *Acta Pharmacol Sin* 37: 1054-1062.
- Thibault K, Calvino B, Dubacq S, Roualle-de-Rouville M, Sordoillet V, Rivals I, Pezet S (2012). Cortical effect of oxaliplatin associated with sustained neuropathic pain: exacerbation of cortical activity and down-regulation of potassium channel expression in somatosensory cortex. *Pain* 153: 1636-1647.
- Tobelaim WS, Dvir M, Lebel G, Cui M, Buki T, Peretz A, Marom M, Haitin Y, Logothetis DE, Hirsch JA, Attali B (2017). Ca²⁺-Calmodulin and PIP2 interactions at the proximal C-terminus of Kv7 channels. *Channels* 11: 686-695.
- Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C, Forrest L (2002). Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J Neurosci* 22: 4103-4113.
- Todd AJ, Wang F (2020). Central Nervous System Pain Pathways. The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain. Oxford University Press.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY (2005). Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron* 45: 379-388.
- Torralba A, Miquel A, Darba J (2014). Situación actual del dolor crónico en España: iniciativa "Pain Proposal". *Revista de la Sociedad Española del Dolor* 21: 16-22.
- Treede R, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Korwisi B, Kosek E, Lavandierhomme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JWS, Wang S (2019). Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain* 160: 19-27.

- Tsantoulas C, McMahon SB (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci* 37: 146-158.
- Tsantoulas C, Zhu L, Yip P, Grist J, Michael GJ, McMahon SB (2014). Kv2 dysfunction after peripheral axotomy enhances sensory neuron responsiveness to sustained input. *Exp Neurol* 251: 115-126.
- van Rijn CM, Willems-van Bree E (2003). Synergy between retigabine and GABA in modulating the convulsant site of the GABAA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 464: 95-100.
- Vetter I, Hein A, Sattler S, Hessler S, Touska F, Bressan E, Parra A, Hager U, Leffler A, Boukalova S, Nissen M, Lewis RJ, Belmonte C, Alzheimer C, Huth T, Vlachova V, Reeh PW, Zimmermann K (2013). Amplified cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition. *J Neurosci* 33: 16627-16641.
- Villalba-Galea CA, Sandtner W, Starace DM, Bezanilla F (2008). S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17600-17607.
- Wang AW, Yang R, Kurata HT (2017). Sequence determinants of subtype-specific actions of KCNQ channel openers. *J Physiol* 595: 663-676.
- Wang AW, Yau MC, Wang CK, Sharmin N, Yang RY, Pless SA, Kurata HT (2018). Four drug-sensitive subunits are required for maximal effect of a voltage sensor-targeted KCNQ opener. *J Gen Physiol* 150: 1432-1443.
- Wang CC, Willis WD, Westlund KN (1999). Ascending projections from the area around the spinal cord central canal: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in rats. *J Comp Neurol* 415: 341-367.
- Wang CK, Lamothe SM, Wang AW, Yang RY, Kurata HT (2018). Pore- and voltage sensor-targeted KCNQ openers have distinct state-dependent actions. *J Gen Physiol* 150: 1722-1734.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282: 1890-1893.
- Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS (2000). Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 57: 1218-1223.
- Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Tempel BL (1994). Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci* 14: 4588-4599.
- Wang J, Liu Y, Hu F, Yang J, Guo X, Hou X, Ju C, Wang K (2021). Activation of Neuronal Voltage-Gated Potassium Kv7/KCNQ/M-Current by a Novel Channel Opener SCR2682 for Alleviation of Chronic Pain. *J Pharmacol Exp Ther* 377: 20-28.
- Watson C, Harvey AR (2009). Chapter 11 - Projections from the Brain to the Spinal Cord. *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego.
- Watson C, Kayalioglu G (2009). Chapter 1 - The Organization of the Spinal Cord. *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature

and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 463-472.

Wickenden AD, Krajewski JL, London B, Wagoner PK, Wilson WA, Clark S, Roeloffs R, McNaughton-Smith G, Rigdon GC (2008). N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluorobenzamide (ICA-27243): a novel, selective KCNQ2/Q3 potassium channel activator. *Mol Pharmacol* 73: 977-986.

Wickenden AD, McNaughton-Smith G (2009). Kv7 channels as targets for the treatment of pain. *Curr Pharm Des* 15: 1773-1798.

Wickenden AD, Zou A, Wagoner PK, Jegla T (2001). Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol* 132: 381-384.

Willis WD, Trevino DL, Coulter JD, Maunz RA (1974). Responses of primate spinothalamic tract neurons to natural stimulation of hindlimb. *J Neurophysiol* 37: 358-372.

Willis WD, Coggeshall RE (2004). Sensory mechanisms of the spinal cord. Kluwer academic - Plenum Publishers, New York.

Wladyka CL, Kunze DL (2006). KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 575: 175-189.

Woolf CJ (2010). What is this thing called pain? *J Clin Invest* 120: 3742-3744.

Woolf CJ, Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-1769.

Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H (2005). The new anticonvulsant

retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol Pharmacol* 67: 1009-1017.

Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M (1995). Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. *J Biol Chem* 270: 24761-24768.

Yarov-Yarovoy V, Baker D, Catterall WA (2006). Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7292-7297.

Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M (2007). Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Physiol* 581: 603-618.

Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151: 475-488.

Yau MC, Kim RY, Wang CK, Li J, Ammar T, Yang RY, Pless SA, Kurata HT (2018). One drug-sensitive subunit is sufficient for a near-maximal retigabine effect in KCNQ channels. *J Gen Physiol* 150: 1421-1431.

Yellen G (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419: 35-42.

Yu H, Wu M, Townsend SD, Zou B, Long S, Daniels JS, McManus OB, Li M, Lindsley CW, Hopkins CR (2011). Discovery, Synthesis,

and Structure Activity Relationship of a Series of N-Aryl- bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamides: Characterization of ML213 as a Novel KCNQ2 and KCNQ4 Potassium Channel Opener. *ACS Chem Neurosci* 2: 572-577.

Yu T, Li L, Liu H, Li H, Liu Z, Li Z (2018). KCNQ2/3/5 channels in dorsal root ganglion neurons can be therapeutic targets of neuropathic pain in diabetic rats. *Mol Pain* 14.

Yus-Nájera E, Muñoz A, Salvador N, Jensen BS, Rasmussen HB, Defelipe J, Villarroel A (2003). Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation. *Neuroscience* 120: 353-364.

Yus-Najera E, Santana-Castro I, Villarroel A (2002). The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem* 277: 28545-28553.

Zaczek R, Chorvat RJ, Saye JA, Pierdomenico ME, Maciag CM, Logue AR, Fisher BN, Rominger DH, Earl RA (1998). Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: comparison to linopirdine. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 724-730.

Zhang F, Mi Y, Qi JL, Li JW, Si M, Guan BC, Du XN, An HL, Zhang HL (2013). Modulation of K(v)7 potassium channels by a novel opener pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one compound QO-58. *Br J Pharmacol* 168: 1030-1042.

Zhang F, Liu Y, Tang F, Liang B, Chen H, Zhang H, Wang K (2019).

Electrophysiological and pharmacological characterization of a novel and potent neuronal Kv7 channel opener SCR2682 for antiepilepsy. *FASEB J* 33: 9154-9166.

Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohács T, Lopes CMB, Jin T, Logothetis DE (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37: 963-975.

Zhang J, Rong L, Shao J, Zhang Y, Liu Y, Zhao S, Li L, Yu W, Zhang M, Ren X, Zhao Q, Zhu C, Luo H, Zang W, Cao J (2021). Epigenetic restoration of voltage-gated potassium channel Kv1.2 alleviates nerve injury-induced neuropathic pain. *J Neurochem* 156: 367-378.

Zhang X, Giesler GJ (2005). Response characteristics of spinothalamic tract neurons that project to the posterior thalamus in rats. *J Neurophysiol* 93: 2552-2564.

Zheng Q, Fang D, Liu M, Cai J, Wan Y, Han J, Xing G (2013). Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* 154: 434-448.

Zhuang W, Yan Z (2021). The S2-S3 Loop of Kv7.4 Channels Is Essential for Calmodulin Regulation of Channel Activation. *Front Physiol* 11.

Zotterman Y (1939). Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J Physiol* 95: 1-28.



Universidad de Alcalá

