



Facultad de Ciencias Biomédicas  
Universidad Austral

# Los Neuropéptidos Tirosina, Galanina, sus Receptores y el Dolor Neuropático

Estudios morfológicos y farmacológicos en el sistema  
nervioso de roedores

Pablo Rodolfo Brumovsky

Pilar, Argentina, 2003



# **Los Neuropeptidos Tirosina, Galanina, sus Receptores y el Dolor Neuropático**

Estudios morfológicos y farmacológicos en el sistema nervioso de roedores

**"Neuropeptides Tyrosine, Galanin, Their Receptors And Neuropathic Pain"**

Morphological and pharmacological studies in rodent nervous system

Pablo Rodolfo Brumovsky

**Director de Tesis:** Prof. Marcelo J. Villar (Universidad Austral)

**Co-director de Tesis:** Prof. Tomas Hökfelt (Instituto Karolinska)

**Facultad de Ciencias Biomédicas  
Universidad Austral  
Pilar, Argentina, 2003**

*Soñad... y os quedaréis cortos!*

(San José María Escrivá de Balaguer)

---

# INDICE

<i>Agradecimientos – Acknowledgments</i>	I-II
<b>Resumen</b>	1
<b>Lista de Proyectos</b>	3
<b>Abreviaturas</b>	4
<b>Objetivos – Objectives</b>	5
<b>Capítulo I</b> - Introducción	7
<b>Capítulo II</b> - Materiales y Métodos	24
<b>Capítulo III</b> - Resultados y Discusión	41
<b>Chapter IV</b> - Results and Discussion	65
<b>Proyectos</b>	
<b>Capítulo V</b> - Efecto de una compresión única graduada del nervio ciático de la rata en la conducta de dolor y la expresión de NPY y el RY1 en neuronas del GARD y la médula espinal	87
<b>Capítulo VI</b> - Acciones pronociceptiva y analgésica receptor-específicas de Galanina en la médula espinal: Acciones selectivas vía receptores GalR1 y GalR2	118
<b>Capítulo VII</b> - Los receptores Y1 para el NPY están presentes en los procesos axonales de las neuronas de los ganglios anexos a la raíz dorsal	136
<b>Capítulo VIII</b> - Distribución del receptor Y1 para el Neuropeptido Y en los tejidos periféricos de roedores	154
<b>Capítulo IX</b> - Caracterización inmunohistoquímica en neuronas aferentes primarias y médula espinal lumbares de ratones que sobreexpresan galanina en neuronas Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa positivas	183
<b>Capítulo X</b> - Distribución del RY1 en neuronas superficiales y profundas del asta dorsal de la médula espinal lumbar de la rata. Análisis de inmunohistoquímica por flotación	206
<b>Referencias</b>	220

# Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro colaboraron en la elaboración de esta tesis (muchos, sufriendome como estudiante de doctorado!).

Al Doctor Marcelo J. Villar, un gran mentor. Su generosidad en los planos laboral y personal no conoce límites, ni tampoco su nivel de exigencia! Es un orgullo y un honor trabajar junto a usted y aprecio enormemente la comprensión y confianza que me brindó durante todo este tiempo.

I am very thankful to my co-supervisor in this thesis, Professor Tomas Hökfelt. The experience in your laboratory at the Karolinska Institutet has had a tremendous impact on my work and thoughts. Your passion and dedication for science is impressive and very moving. Besides, thanks for being at all times an extremely good person.

Agradezco al Doctor Tomás A. Mascitti, por su amabilidad y apoyo en mis inicios como investigador.

Deseo agradecer a la Doctora Angela Suburo por recibirme cordialmente en el laboratorio. Gracias por muchas discusiones fructíferas.

Mi agradecimiento a la Doctora Valeria Cantó Soler. Gracias por tu compañerismo, espíritu alegre y ayuda. Espero que el futuro nos permita continuar nuestras actividades (y mateadas) en este laboratorio que crece.

Gracias por la experta enseñanza y generosa ayuda en todo lo relacionado con inmunohistoquímica y fotografía a los hermanos Silvina y Germán Ruffolo y a la señora Isabel Farías.

Agradezco la ayuda y “buena onda” de todos los doctorandos: Jorge Aquino, Vanesa Torbidoni, Florencia Coronel, Patricia Musolino, María Iribarne, Liliana Ogawa y Federico Luengo. Gracias a Guillermo Gastón por ocuparse de los animales. También, mi agradecimiento por generar un ambiente agradable y discusiones interesantes a Cristina Defagot, Beatriz Settembrini y Susana Nowicki. Gracias a todo el staff de ayudantes de anatomía, por su apoyo constante y a los alumnos que han compartido mis preocupaciones y frecuentes “rayes”.

Mi agradecimiento también a mucha gente de la Facultad y el Hospital de la Universidad Austral quienes han colaborado conmigo durante estos años, directa o indirectamente: Angeles Schlegel, Graciela Tenreyro, María del Carmen Quirós, Carla Raghianti, Angel Centeno, Alejandra Blanco, Edgardo Narbais, Marina Sundblad,

Pablo Lanús y Matías Arrese; a los doctores César Bergadá, Leonardo McLean, Juan Gallo, Soledad Campos, Carlos Autorino, Fernando Iudica, Eduardo Mutto, Carlos Cavazzoli y Carlos Luque. Gracias a los Padres Fernando Miguens, Fermín Landa y Gustavo Páez. Es muy posible que esté olvidando a alguna persona. No se trata de un problema de espacio sino de despiste! Pido disculpas y acepto nombres para agregar a la fe de erratas!

Agradezco la paciencia y el apoyo incondicional de todos mis buenos amigos: Matías Gilardenghi, Alejandro Denysenko, Nelson Jordan, Argeme A. Pebe Pueyrredón, Melina, Paola y Sebastián Alvarez, Pablo Delgado, Fernanda y Gustavo Paratcha, Julio y Patricia Martinez, Xavier y Yolanda, Javier y Ainoa, Florencia y Pilar Laje.

I also want to thank to all my colleagues in Stockholm, starting by Katarina Åman and Siv Nilson, for sharing their expertise in the immuno- and in situ labs with me. Thanks a lot for the help, friendship and interesting/funny discussions to Serguei Fettisov, David Xu, Sten Shi, Eugenia Kutteeva, Hideki Matsuda, Ruud Ubink, Margarita Diez, Nóra Kerekes, Hong-Xiang Liu, Jutta Kopp, Ulla Kopp, Christoph Hofstetter, Juan José Aguirre, Alberto Del Arco, Alicia Rivera Ramírez, Karin Lagerman, Ida Enqvist and Tommy Rymman.

Finalmente, deseo agradecer a mi familia. A mis padres, a quienes les debo todo. Esta tesis refleja su paciencia y esmero en guiarnos en el sendero hacia una vida profesional y humana elevados. Me enorgullece poder representar a la familia con esta Tesis Doctoral. A mis hermanos Sonia, Andrés y Lucas, porque se han bancado lo inbancable durante este período de formación, y más de una vez me brindaron su apoyo. Gracias también a mis dos abuelas, Maria Kotaš y Lidia Matuška. Gracias en serio, porque mucho menos se hubiera hecho sin la ayuda de todos ustedes.

## RESUMEN

En la presente tesis se encara el estudio de dos péptidos, el neuropéptido tirosina (NPY) y la galanina (Gal), en el contexto de las neuronas aferentes primarias y la médula espinal y su relación con la producción del dolor neuropático. Asimismo, son analizados algunos de los receptores vinculados a estos dos neuropéptidos: los receptores RY1 e -Y2 para NPY y RGal1 y -2 para Gal.

En condiciones normales, la expresión del NPY y Gal en neuronas de los ganglios anexos a la raíz dorsal (GARDs) lumbares de la rata se encuentra por debajo de los niveles detectables por inmunohistoquímica. Sin embargo, la lesión del nervio ciático induce un dramático aumento en la expresión de estos dos péptidos en neuronas grandes/medianas (NPY) y pequeñas (Gal) principalmente. Asimismo, la expresión del RY1, normalmente presente en un subgrupo de neuronas pequeñas de los GARDs, sufre una marcada disminución. En esta tesis, introdujimos una variación del modelo de Bennett de compresión del nervio ciático con cuatro ligaduras, usando una ligadura única de grado variable, y comparamos los efectos inducidos en la expresión del NPY y el RY1 con la axotomía, considerando su posible relación con la inducción de dolor crónico. Pudimos observar que los cambios en la expresión del NPY (aumentando) y el RY1 (disminuyendo) ocurren en directa relación con el grado de compresión del nervio ciático; esto es, a mayor compresión, cambios más dramáticos. Notablemente, la compresión media ( $\approx 50\%$ ) del nervio ciático indujo la disminución más marcada del umbral de alodinia mecánica de los animales, presentando también alteración en la expresión de los mencionados marcadores. Estos resultados sugieren un rol del sistema NPYérgico en los mecanismos del dolor crónico.

En segundo lugar, estudiamos los efectos de dos agonistas selectivos para los receptores galaninérgicos en el desarrollo del dolor por neuropatía periférica, con el fin

de dilucidar el conflictivo rol de Gal como agente pro- y/o antinociceptivo. Pudimos observar que el efecto antinociceptivo de Gal ocurre por activación del RGal-1, en especial luego de la lesión de un nervio periférico, mientras que la activación del RGal-2 induce dolor.

Hemos analizado también la expresión del RY1 tanto en neuronas aferentes primarias como en tejidos periféricos de roedores. En contraste con lo establecido hace más de una década, observamos que este receptor es efectivamente transportado por la vía axonal, y su ubicación no se limita a la porción somática de la neurona. Finalmente, complementamos los estudios farmacológicos que otorgan un rol en vasos sanguíneos de medio y pequeño calibre al RY1, al demostrar morfológicamente la presencia del receptor en lechos vasculares de numerosos tejidos de la rata y el ratón. Sorpresivamente, también detectamos al RY1 en vasos capilares de la glándula tiroides, así como en células parenquimatosas de varios órganos incluyendo páncreas y médula adrenal.

Estas observaciones sugieren un papel mucho más amplio para el NPY en la transducción de información sensitiva en virtud de la localización del RY1 en proyecciones periféricas de neuronas aferentes primarias. La presencia del receptor en los lechos vasculares de prácticamente todo tejido estudiado realza su rol en la modulación del flujo sanguíneo, mientras que su detección en varias células parenquimatosas abre numerosas e inquietantes incógnitas acerca de su actividad en tejidos periféricos.



Esta Tesis se basa en los siguientes trabajos publicados:

**“Effect of a graded single constriction of the rat sciatic nerve on pain behavior and expression of immunoreactive NPY and NPY Y1 receptor in DRG neurons and spinal cord”**. Brumovsky PR, Bergman E, Liu HX, Hökfelt T, Villar MJ. *Brain Research, in press*

**“Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: Selective action via GalR1 and GalR2 receptors”**. Liu HX, Brumovsky PR, Schmidt R, Brown W, Payza K, Hodzik L, Pou C, Godbout C, Hökfelt T. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001, 98(17): 9960-9964.

**“NPY Y1 receptors are present in axonal processes of DRG neurons”**. Brumovsky PR, Shi T-J, Matsuda H, Kopp J, Villar MJ, Hökfelt T. *Experimental Neurology* 2002, 174: 1-10.

**“Distribution of Neuropeptide Y Y1 Receptors in Rodent Peripheral Tissues”**. Matsuda H, Brumovsky PR, Kopp J, Pedrazzini T, Hökfelt T. *The Journal of Comparative Neurology* 2002, 449: 390-404.

También se incluyen resultados preliminares de los siguientes proyectos:

**“Caracterización inmunohistoquímica en neuronas aferentes primarias y médula espinal lumbares de ratones que sobreexpresan galanina en neuronas dopamina- $\beta$ -hidroxilasa-positivas)”**

Brumovsky PR, Hygge-Blakeman K, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar MJ, Hökfelt T

**“Distribución del RY1 en neuronas superficiales y profundas del asta dorsal de la médula espinal lumbar. Análisis de inmunohistoquímica por flotación”**

Brumovsky PR, Villar MJ, Hökfelt T

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina- $\alpha$ de músculo liso
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATF-3</b>	factor 3 activador de la transcripción
<b>Axo</b>	Axotomía
<b>BP</b>	buffer fosfato
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Catión Calcio
<b>CGRP</b>	Péptido Relacionado al Gen de la Calcitonina
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion Cloro
<b>C-Pon</b>	Segmento C-terminal del NPY
<b>CUNP</b>	Compresión unica de nervio periférico
<b>Cy3</b>	Cianina 3
<b>Cy5</b>	Cianina 5
<b>DABCO</b>	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>Gaba</b>	Acido gama amino butírico
<b>Gal</b>	Galanina
<b>GalSE</b>	Ratón galanina sobre-expresante
<b>GARD</b>	Ganglio anexo a la raíz dorsal
<b>GMAP</b>	Péptido asociado al mensajero de Gal
<b>GSS</b>	Ganglio simpático supracervical
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HRP</b>	Peroxidasa del rábano picante
<b>i.t.</b>	Intratecal
<b>IB4</b>	Isolecitina B4
<b>ICC</b>	Injuria por compresión crónica
<b>-IR</b>	Inmunoreactivo/a
<b>K<sup>+</sup></b>	Catión Potasio
<b>KO</b>	Knock-out
<b>LRSC</b>	Lissamina-Rodamina
<b>MAD</b>	Desviación absoluta de la mediana
<b>MAPk</b>	Proteína quinasa mitógeno activada
<b>MBP</b>	Proteína básica de mielina
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ión Sodio
<b>NPY</b>	Neuropeptido Tirosina
<b>PBS</b>	Buffer fosfato sódico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF-b</b>	Factor de crecimiento $\beta$ derivado de plaquetas
<b>PGP 9.5</b>	Producto proteico del gen 9.5
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PNMT</b>	Feniletanolamina N-metil transferasa
<b>PNs</b>	Perfiles neuronales
<b>RGal1</b>	Receptor tipo 1 de Gal
<b>RGal2</b>	Receptor tipo 2 de Gal
<b>RGal3</b>	Receptor tipo 3 de Gal
<b>RNK-1</b>	Receptor tipo 1 de neurokinina
<b>RT-PCR</b>	PCR de transcripción reversa
<b>RY1</b>	Receptor Y1 del NPY
<b>RY2</b>	Receptor Y2 del NPY
<b>RY3</b>	Receptor Y3 del NPY
<b>RY5</b>	Receptor Y5 del NPY
<b>SEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>SP</b>	Sustancia P
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>TNB</b>	Buffer Tris-Sodio de bloqueo
<b>TNT</b>	Buffer Tris-Sodio de lavado
<b>TSA</b>	Inmunofluorescencia amplificada por tiramida
<b>WDR</b>	Neuronas de rango dinámico amplio
<b>Wt</b>	Ratón de tipo salvaje

**Objetivos**

**(Objectives)**

## Objetivos

1. Análisis de los cambios inducidos por un nuevo modelo de lesión neural desarrollado en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral, la Compresión Unica del Nervio Periférico (CUNP), con grados variables de compresión (Intenso, Medio, Suave), sobre la expresión de los neuropéptidos Galanina y Neuropéptido Tirosina, y algunos de sus receptores asociados (RGal1, -2; RY1 e- Y2) en los GARDs y el asta dorsal de la médula espinal (**Capítulo V**).
2. “Disección” farmacológica de las acciones pro- y antinociceptiva de Gal, dependiente del subtipo de receptor involucrado (RGal1, -2), estudiando la acción de agonistas selectivos para receptores galaninérgicos sobre la conducta de dolor en ratas normales y neuropáticas (**Capítulo VI**).
3. Demostración del transporte del RY1 a través de las proyecciones periféricas y centrales de las neuronas aferentes primarias lumbares (**Capítulo VII**).
4. Estudio de la distribución del RY1 en varios tejidos periféricos de roedores, con particular énfasis en la presencia del mismo en tejido vascular y algunas células parenquimatosas (**Capítulo VIII**).
5. Caracterización inmunohistoquímica de las neuronas aferentes primarias y médula espinal lumbares de ratones que sobreexpresan Gal en neuronas Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa-positivas (**Capítulo IX**).
6. Descripción de las diferentes poblaciones neuronales en el asta dorsal de la médula espinal lumbar RY1-IR, con particular énfasis en la presencia del receptor en neuronas de las láminas profundas (**Capítulo X**).

## Objectives

1. Analysis of the changes in the expression of the neuropeptides Galanin and Neuropeptide Tyrosine, and some of its receptors (GalR1 and -R2; Y1- and Y2R) in lumbar DRGs and the dorsal horn of the spinal cord of animals after a new peripheral nerve lesion developed in the Faculty of Biomedical Sciences of the Austral University, the Single Ligature Nerve Constriction (SLNC), with different degrees of constriction (Strong, Medium, Light) (**Chapter V**).
2. Pharmacological “dissection” of the pro- and antinociceptive role of Gal, depending on the receptor subtype being activated (GalR1, -R2), by testing the action of selective agonists for Gal receptors on pain behavior in normal and neuropathic rats (**Chapter VI**).
3. Demonstration of the transport of the Y1R through the peripheral and central projections of primary afferent neurons(**Chapter VII**).
4. Evaluation of the distribution of the Y1R in several rodent peripheral tissues, with particular emphasis on its presence in vascular tissue and some parenquimal cells (**Chapter VIII**).
5. Immunohistochemical characterization of lumbar primary afferent neurons and spinal cord of Gal overexpressing mice which do so in Dopamine- $\beta$ -hydroxylase-positive neurons (**Chapter IX**);
6. Description of the different Y1R-immunoreactive neuronal populations present in the dorsal horn of the lumbar spinal cord, with particular emphasis on their presence in deep laminae (**Chapter X**).



# Introducción

## Neuronas sensoriales primarias y médula espinal

El elemento básico necesario para la recepción y transmisión de la información sensorial percibida en los distintos tejidos periféricos del cuerpo es la neurona aferente primaria. Estas se agrupan en acúmulos neuronales denominados ganglios anexos a la raíz dorsal (GARD), ubicados en forma segmental a los lados de la médula espinal.

Típicamente, las neuronas aferentes primarias producen un proceso axonal corto que no tarda en dividirse en dos proyecciones (Hendry et al., 1999), una que se dirige hacia la periferia (piel, músculos, vísceras) por vía de los nervios periféricos, y otra central que ingresa al asta dorsal de la médula espinal a través de la raíz dorsal (Fig. I.1). Clásicamente, se identifica a los distintos tipos neuronales presentes en los GARDs en base al tamaño de sus cuerpos celulares, el diámetro y características de conducción de sus proyecciones axonales, o el tipo de neurotransmisor que producen (Willis y Coggeshall, 1991; Julius y Basbaum, 2001; Lawson, 1992, 1996, 2002) (Cuadro I.1).

Se distingue así entre neuronas de bajo umbral que normalmente transmiten estímulos no-nociceptivos de baja intensidad, y neuronas nociceptivas de alto umbral las cuales responden a estímulos de alta intensidad y potencialmente dañinos (Lawson, 2002). Por otro lado, las neuronas aferentes primarias se subdividen en *claras* (ricas en neurofilamentos), usualmente grandes y productoras de fibras rápidas tipo A, y *oscuras* (pobres en neurofilamentos), pequeñas y productoras de fibras lentas de tipo C (Cuadro I.1) (Lawson y Waddell, 1991). Las neuronas productoras de fibras C componen el grupo mayoritario de neuronas nociceptivas, seguidas de las que originan fibras A (Lawson, 2002). Asimismo, las fibras de tipo A se subdividen en A $\delta$  y A $\alpha/\beta$ . Finalmente, existe un cuarto tipo de fibras para las cuales se hace difícil definir la clase de estímulo al que responden, denominadas nociceptores “silenciosos” o “durmientes”.

En el contexto de las neuronas nociceptivas, las fibras finas C, a través de receptores de alto umbral, se encargan de la transmisión de información térmica y/o mecánica dolorosa (Millan, 1999). Asimismo, una subvariedad de fibras C llamadas polimodales, transmiten no sólo estímulos mecánicos nocivos y calóricos, sino también químicos irritantes (Bessou y Perl, 1969; Kumazawa y Perl, 1977; Millan, 1999; Julius y Basbaum, 2001). En segundo lugar, las fibras A $\delta$ , separadas en fibras de tipo I y II, transmiten estímulos mecánicos dolorosos de alto umbral y calor no-nociceptivo (I), o calor nociceptivo de bajo umbral (I), respectivamente (Burgess y Perl, 1967; Treede et al., 1990a, b; Beydoun et al., 1996; Raja et al., 1999). Las fibras C y A $\delta$  II son sensibles a la capsaicina, mientras que las A $\delta$  I son insensibles a la misma (Kirschstein et al., 1999; Nagy y Rang, 1999). Respecto de las fibras mielínicas gruesas A $\beta$ , se las asocia clásicamente a respuestas de tipo táctil, vibratoria y de presión, así como otros modos de estímulo no-nociceptivo, aunque con la potencial capacidad de transmisión de información dolorosa exclusivamente luego de la injuria neural (Willis y Coggeshall, 1991; Mense, 1993; Woolf et al., 1994; Wilson et al., 1996). Sin embargo, esta podría ser una apreciación parcializada de la capacidad de conducción de estímulos dolorosos por parte de fibras gruesas, ya que existirían neuronas nociceptivas “*per se*” productoras de fibras A $\alpha/\beta$  (Lawson, 2002). De hecho, se ha demostrado que las neuronas A-nociceptivas en la rata producen un 65-67% de fibras A $\alpha/\beta$  (Ritter y Mendell, 1992). Esta distinción podría tener gran importancia para el entendimiento de la fisiopatología de lesiones de nervios periféricos a predominio de fibras A $\alpha/\beta$ .

**Fig. I.1.** Dibujo esquemático de la organización básica del aparato neural encargado de la recepción y transmisión de información sensorial y dolorosa hacia la médula espinal y niveles superiores del sistema nervioso central. Obsérvese que existen distintos tamaños celulares en el GARD lumbar de la rata. En la médula espinal se detalla la clara división de ambas astas dorsal y ventral en 10 láminas.

**Fig. I.1.** Schematic drawing of the basic organization of the neural machinery for the reception and transmission of sensorial information, including pain to the spinal cord and upper levels of the central nervous system. Note that different cell sizes are present in a rat lumbar DRG. In the spinal cord, there is a clear division of the dorsal and ventral horn into 10 laminae.

**Tabla I.1.** Resumen de las características principales de los diferentes tipos de fibras aferentes primarias producidas por neuronas de un GARD lumbar (Tomado de Millan, 1999; Lawson, 1996).

**Table I.1.** Summary of the principal characteristics of different primary afferent fibers produced by neurons of a lumbar DRG (Taken from Millan, 1999; Lawson, 1996).



Parte de las proyecciones centrales de los GARDs ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales, haciendo sinapsis en neuronas locales y de proyección localizadas en las láminas superficiales y profundas del asta dorsal de la médula espinal.

La médula espinal, como todas las otras partes del sistema nervioso central (SNC), se halla estructurada en dos áreas bien definidas: la sustancia gris y la sustancia blanca (Fig. I.1). La sustancia gris se compone de cuerpos neuronales, células gliales, y fibras dendríticas y axonales. Las células gliales proveen una suerte de almacén en el que las neuronas se organizan, aunque su rol sobrepasa ampliamente la función de sostén y de “recolección de deshechos”, pudiendo además generar o modular diversos tipos de señales interneuronales (Watkins et al., 2001; Watkins y Maier, 2002). La sustancia blanca por su parte, se compone mayoritariamente de proyecciones organizadas en fibras ascendentes y descendentes con variado origen (neuronas locales de la sustancia gris medular, aferencias de los GARDs y distintas partes del SNC), así como también células gliales. Cortes transversales de la médula espinal muestran que la sustancia gris, de localización central y rodeada por sustancia blanca, se divide en astas denominadas dorsal, ventral y lateral (esta última, sólo en niveles torácicos). En ellas, la disposición de diferentes poblaciones neuronales ha permitido la división en diez láminas (Rexed, 1952) (Fig I.1).

El asta dorsal se divide en seis láminas, en las cuales converge información exteroceptiva (tacto discriminativo, temperatura) y/o dolorosa, a través de fibras aferentes primarias que terminan haciendo sinapsis con neuronas locales, con un patrón específico para cada tipo de fibra e información transportada (ver Millan, 1999; Todd, 2002 y sus referencias). A su vez, esta información es potencialmente modulada, y retransmitida a niveles superiores del SNC. Las fibras de tipo A $\delta$  y C, terminan mayoritariamente en las láminas superficiales del asta dorsal (Burgess y Perl, 1973;

Zimmermann, 1976; Light y Perl, 1979; Fyffe, 1984), mientras que las fibras mielínicas de gran calibre ( $A\alpha/\beta$ ) se hacen más profundas e ingresan a las láminas III-IV (Ramón y Cajal, 1909; Brown, 1981; Ralston y Ralston, 1982) (Fig. I.1). Sin embargo, se han descrito fibras finas también en la lámina III (LaMotte, 1977; Light y Pearl, 1979; Sugiura et al., 1987). Un tercer grupo de fibras aferentes a la médula espinal inicia inmediatamente, y sin detenerse, un recorrido ascendente por los cordones posteriores de la médula espinal lumbar, dorsal y cervical hasta hacer sinapsis con neuronas de los núcleos delgado y cuneiforme en el bulbo raquídeo. Sin embargo, varias de estas fibras emiten colaterales hacia las láminas II-IV antes de iniciar el ascenso (Bennett et al., 1983; Hendry et al., 1999). Este grupo transmite información propioceptiva (tacto profundo y vibración) (Willis y Coggeshall, 1991), aunque debe recordarse el componente de fibras  $A\alpha/\beta$  que posiblemente transmita impulsos dolorosos a las láminas profundas del asta dorsal (Lawson, 2002).

Existen tres tipos neuronales encargados de recibir estímulos sensitivos periféricos en el asta dorsal (Dubner y Bennett, 1983; Dubner et al., 1989; Willis y Coggeshall, 1991; Mense, 1993; Schaible y Grubb, 1993; Cervero, 1995). En primer lugar, las neuronas nociceptivas, recibiendo específicamente estímulos dolorosos de gran intensidad por medio de fibras C y  $A\delta$  ubicadas mayormente en las láminas I y II. Un segundo grupo lo constituyen las neuronas de rango dinámico amplio (WDR), las que reciben información convergente desde piel, músculos y vísceras, y se encuentra predominantemente en la lámina V (Mense, 1986; Ness y Gebhart, 1990; Mense, 1993; Gebhart, 1995). Estas neuronas reciben información térmica, mecánica y química vía fibras C y  $A\delta$ , así como  $A\alpha/\beta$ ; además, son capaces de percibir la intensidad del estímulo (Dubner et al., 1989).

**Fig. I.2.** Dibujo esquemático detallando la expresión de diferentes neuropéptidos y receptores en los GARDs y la médula espinal lumbares en condiciones normales (A) y luego de la lesión nerviosa periférica en la rata (B). (A) En condiciones normales, neuronas pequeñas y medianas expresan niveles detectables de CGRP, SP, RGal2 y RY1, mientras que neuronas más grandes expresan principalmente RGal1, RY2 y algunas CGRP. En el asta dorsal de la médula espinal, se observa la expresión de Gal, NPY, SP, RGal1, RNK1 y RY1 en neuronas de proyección e interneuronas. (B) La lesión de un nervio periférico induce una disminución dramática en la expresión de varios de los marcadores antes mencionados en los GARDs, además de la aparición de NPY, Gal y NOS. Por su parte, la expresión neuronal de los péptidos y receptores detallados en el asta dorsal de la médula, parece no alterarse sustancialmente. Además, la expresión de la proteína básica de mielina (MBP), normalmente homogénea en la vaina de mielina (A), sufre una alteración dramática luego de la lesión del nervio ciático, formándose agregados protéicos posiblemente degenerativos (B).

**Fig. I.2.** Schematic drawing showing the expression of different neuropeptides and receptors in normal conditions (A) and after peripheral nerve lesion (B) in the lumbar DRGs and the spinal cord of rat. (A) In normal conditions, small and medium-sized neurons express detectable levels of CGRP, SP, GalR2 and Y1R, while larger neurons mainly express GalR1, Y2R and some CGRP. In the dorsal horn of the spinal cord one can observe Gal, NPY, SP, GalR1, NK1- and Y1R expression in interneurons and projection neurons. (B) The lesion of a peripheral nerve induces dramatic changes in the expression of several of the above mentioned markers in the DRGs, as well as a strong upregulation of NPY, Gal and NOS. On the other hand, the neuronal expression of the peptides and receptors indicated in the dorsal horn seems to be unaffected after the lesion. Also, the usually homogeneous expression of myelin basic protein (MBP) (A) shows a strong disturbance after the sciatic nerve lesion, with the formation of protein aggregates.

En tercer lugar, se observan neuronas no-nociceptivas, ubicadas en laminas II, III y IV (ver Millan, 1999; Basbaum y Bushnell, 2002). Sin constituir neuronas de proyección como las mencionadas anteriormente, se observa también un número importante de interneuronas con funciones modulatorias de la actividad de recepción y retransmisión de estímulos sensoriales en las láminas I a IV (Basbaum y Bushnell, 2002).

### **Neurotransmisores producidos en los GARDs**

Un número considerable de moléculas producidas por neuronas aferentes primarias se encuentran relacionadas con procesos de neurotransmisión, entre las que figuran neurotransmisores excitatorios como el Glutamato y el Aspartato; adenosin trifosfato (ATP), diversos neuropéptidos como la sustancia P (SP), el Péptido Relacionado al Gen de la Calcitonina (CGRP), el neuropéptido tirosina (NPY) y la galanina (Gal) (ver Ju et al., 1987; Dalsgaard, 1988; Willis y Coggeshall, 1991; Millan, 1999) (Fig. I.2a).

Asimismo, receptores adrenérgicos ( $\alpha 1/-2$ ), para opioides ( $\mu$  y  $\delta$ ) y para neuropéptidos (ver más abajo) y factores tróficos como el BDNF son también producidos por neuronas aferentes primarias (Willis y Coggeshall, 1991; Lawson, 1992; Millan, 1999).

La lesión de las proyecciones periféricas de las neuronas aferentes primarias induce cambios drásticos en la expresión de numerosos genes (Costigan et al., 2002; Wang et al., 2002; Xiao et al., 2002), reflejándose en cambios fenotípicos de varias de las moléculas mencionadas más arriba (Nahin et al., 1994; Hökfelt et al., 1994a; Munglani et al., 1995; 1996) (Fig. I.2b).

## Neuropéptidos y sus receptores

Desde la fundamental publicación de von Euler y Gaddum en 1931 (ver Hökfelt et al., 2001), sugiriendo la presencia de una sustancia desconocida en el intestino y el cerebro de conejo y que denominaron sustancia P (SP); los estudios pioneros de Fred Lembeck, indicando que este péptido tendría un rol como neurotransmisor sensorial (Lembeck, 1953) y, la identificación, síntesis y mapeo de la SP por el grupo de Susan Leeman (Chang et al., 1971; Tregear et al., 1971; Powell et al., 1973), una gran cantidad de neuropéptidos fueron descubiertos, muchos de los cuales se encontraron también en neuronas aferentes primarias. Al mismo tiempo, se descubrieron diferentes tipos y subtipos de receptores para SP (Teichberg et al., 1981; Masu et al., 1987), Gal (Branchek et al., 2000) y NPY (Larhammar, 1996), así como las vías intracelulares relacionadas con ellos (Iisma y Shine, 1999; Silva et al., 2002).

En la presente tesis, se estudian los neuropéptidos Gal y NPY, y sus receptores RGal1 y -2, RY1 e -Y2, respectivamente.

***Galanina.*** Galanina es un péptido de 29 aminoácidos originalmente aislado del intestino de cerdo (Tatemoto et al., 1983). Su extensa distribución en el sistema nervioso y algunas glándulas endócrinas, sugiere una amplia gama de funciones, entre las que se incluye la transmisión del dolor (Hökfelt et al., 1991; Wiesenfeld-Hallin et al., 1992a; Hökfelt et al., 1998a; Xu et al., 2000b; Wynick et al., 2001). Asimismo, se ha descrito el rol trófico de Gal (Kerr et al., 2000), actuando a través del RGal2 en procesos de ramificación axonal de neuronas aferentes primarias lesionadas (Mahoney et al., 2003), lo que parece no asociarse a los RGal1s (Hygge-Blakeman et al., 2003a). Normalmente, los niveles de expresión del ARNm y la proteína de Gal en neuronas aferentes primarias de la rata son bajos y presentes sólo en algunas neuronas pequeñas (Hökfelt et al., 1987;



Villar et al., 1989), mientras que en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal, se observa un denso plexo fibroso Gal-IR en las láminas superficiales del asta dorsal originado principalmente en neuronas locales Gal-IR, las cuales expresan ácido gamma-amino-butírico (GABA), encefalina y NPY (Simmons et al., 1995; Zhang et al., 1995e) (Ver Fig. I.2a). Sin embargo, la axotomía o compresión del nervio ciático induce un dramático incremento en los niveles de expresión del mensajero (Hökfelt et al., 1987; Villar et al., 1989, 1991; Ma y Bisby, 1997; Shi et al., 1999) y la proteína de Gal en aproximadamente un 40-50% de todas las neuronas de los GARDs lumbares de la rata, en especial en neuronas pequeñas (Hökfelt et al., 1987; 1994a; Shi et al., 1999) (Fig. I.2b). Estos eventos inducen el aumento considerable de la inmunoreactividad para Gal, tanto en láminas superficiales (I-II) así como profundas del asta dorsal de la médula espinal (III-VI) (Zhang et al., 1995c), esto último como probable consecuencia del aumento de la expresión de Gal en varias neuronas de tamaño grande de los GARDs afectados (Zhang et al., 1995c). Todos estos eventos se acompañan de un aumento en la secreción de Gal desde las terminales aferentes al asta dorsal (Colvin et al., 1997).

Gal actúa sobre una variedad de receptores acoplados a proteínas G toxina pertussis-sensitivas ( $G_i/o$ ) las cuales activan diversas cascadas intracelulares (Branchek et al., 2000) (Fig. I.3a). Así, se han descrito tres tipos de receptores para Gal, RGal1, -2 y -3 (Habert-Ortoli et al., 1994; Burgevin et al., 1995; Parker et al., 1995; Howard et al., 1997; Wang et al., 1997a; 1997b; Ahmad et al., 1998). En condiciones normales, se observa una considerable expresión del ARNm de RGal1 y -2 en neuronas grandes y pequeñas de los GARDs, respectivamente (Xu et al., 1996b; Shi et al., 1997), mientras que en la médula espinal, RGal1 constituye el receptor predominante, y en especial en

**Fig. I.3.** Representaciones esquemáticas de las diferentes vías intracelulares a las cuales se hallan acoplados los receptores para Gal (A) y el NPY (B). AC: adenilato ciclasa; ATP: adenosina trifosfato; cAMP: 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico; PLC: fosfolipasa C; PIP2: 4,5-fosfatidil inositol difosfato; IP3: 1,4,5-inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; ROCC: canal de calcio operado por receptor; K<sup>+</sup>: potasio; Gi/o: proteína G inhibitoria; Gq: proteína G estimuladora (Tomado de Iisma y Shine, 1999 (A); Silva et al., 2002 (B)).

**Fig. I.3.** Schematic representations of the different intracellular pathways to which the neuropeptides Gal (A) and NPY (B) are coupled. AC: adenilate cyclase; ATP: adenosine triphosphate; cAMP: 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate; PLC: phospholipase C; PIP2: phosphatidyl inositol 4,5-diphosphate; IP3: inositol 1,4,5-triphosphate; DAG: diacylglycerol; ROCC: receptor operated calcium channel; K<sup>+</sup>: potassium; Gi/o: inhibitory G protein; Gq: stimulatory G protein (Taken from Iisma and Shine, 1999 (A); Silva et al., 2002 (B)).

las láminas más superficiales (O'Donnell et al., 1999; Waters y Krause, 2000) (ver Fig. I.2a). La axotomía del nervio ciático induce una disminución en la expresión del ARNm de ambos tipos de receptor en neuronas aferentes primarias (Xu et al., 1996; Zhang et al., 1998b; Shi et al., 1997), sin afectar la de RGal1 a nivel espinal (Zhang et al., 1998b) (Ver Fig. 1.2b).

**Neuropéptido Tirosina.** Este péptido de 36 aminoácidos descrito por Tatemoto y Mutt en 1982, es uno de los neuropéptidos con mayor distribución en el SNC (Allen et al., 1983a; Chronwall et al., 1985; de Quidt y Emson, 1986a, b), y el sistema nervioso periférico (SNP) (Lundberg, 1983; Mutt et al., 1989; Allen y Koenig, 1990). Al igual que Gal, está involucrado en numerosas funciones a nivel central y periférico (Mutt et al., 1989; Allen y Koenig, 1990; Hökfelt et al., 1998b), y es uno de los péptidos más altamente conservados desde el punto de vista evolutivo (White, 1993). Usualmente, se observan neuronas NPY-IR aisladas en los GARDs lumbares (Gibson et al., 1984a; Wakisaka et al., 1991; 1992; Zhang et al., 1993a; Nahin et al., 1994; Ohara et al., 1994). Por el contrario, la expresión del péptido es abundante en las láminas superficiales del asta dorsal, en un plexo fibroso originado principalmente en interneuronas locales de las láminas I y II (Gibson et al., 1984a), las cuales coexpresan GABA (Rowan et al., 1993) (Ver Fig. I.2a). Al igual que para Gal, la lesión nerviosa periférica induce un marcado aumento en la expresión del mensajero y proteína del NPY, pero en este caso en neuronas de tamaño mediano y grande de los GARDs (Wakisaka et al., 1991; Shi et al., 1999). Este aumento se traduce a su vez en un incremento en el transporte central del péptido, generando un aumento de su inmunoreactividad en láminas profundas del asta dorsal (Wakisaka et al., 1991; Shi et al., 1999) (ver Fig. I.2b) así como de su secreción (Mark et al., 1998).

Hasta el momento, se han descrito 5 subtipos de receptor para NPY (Herzog et al., 1992; Gerald et al., 1995; Rose et al., 1995; Gerald et al., 1996; Larhammar, 1996; Lundell et al., 1996), constituyéndose en el grupo más grande de la familia de receptores con siete segmentos transmembrana y acoplados a proteína G (Parker et al., 1999). En los GARDs, los RY1 e -Y2 adquieren la mayor relevancia. Así, los RY1 se expresan en neuronas pequeñas y algunas medianas (Zhang et al., 1994a, b; 1999), y son considerados postsinápticos (Wahlestedt et al., 1986). Por su parte, los RY2 se expresan principalmente en neuronas grandes (Zhang et al., 1997) (ver Fig. I.2a), y se refieren como presinápticos (Wahlestedt et al., 1986). Los distintos receptores para NPY utilizan vías de transducción intracelulares similares (Fig. I.3b). En la mayoría de los casos, se hallan acoplados a proteínas Gi/o, produciendo la inactivación de la enzima adenilil-ciclasa (Michel, 1991). Por otro lado, participan en los cambios intracelulares de  $Ca^{2+}$ , ya sea modulando la actividad de las vías dependientes de inositol trifosfato, así como la activación o inhibición de canales de  $Ca^{2+}$  presentes en la membrana plasmática. Aún más, los receptores para NPY estarían también acoplados a receptores de  $K^+$ , y serían capaces de activar la vía del óxido nítrico (para una exhaustiva revisión, ver Silva et al., 2002).

La axotomía del nervio ciático induce un marcado descenso en la expresión del mensajero del RY1 en neuronas de los GARDs (Zhang et al., 1994a; 1995d) (ver Fig. I.2b). Sin embargo, se ha descrito un aumento en el número de perfiles neuronales (PNs) pequeños y grandes levemente RY1-IRs (Zhang et al., 1994a). Por el contrario, el ARNm del RY2 muestra un claro aumento de su expresión en numerosas neuronas pequeñas así como varias grandes (Zhang et al., 1997) (ver Fig. I.2b). A nivel espinal, no se han reportado cambios en la expresión del RY1 luego de la

sección del nervio ciático (Zhang et al., 1994a; Nazli y Morris, 2000) o las raíces dorsales (Brumovsky et al., 2002) (Ver Fig. I.2b).

### **Dolor fisiológico vs. Dolor patológico**

El dolor puede ser separado en dos tipos básicos, dependiendo del origen, mecanismo fisiopatológico y el fin último de su generación (Millan, 1999; Woolf y Salter, 2000). Así, se describe un dolor “fisiológico”, agudo o subcrónico y que refleja la activación de receptores periféricos especializados (nociceptores). La respuesta a tal activación, cuyo rol es dar alarma de una situación peligrosa, está relacionada con mecanismos reflejos, integrados a nivel de las astas ventral (reflejos motores) y dorsal (antinocicepción) de la médula espinal y que tienen como fin último la protección y recuperación del área corporal afectada (Millan, 1986; Wiertelak et al., 1994; Traub, 1997).

Por el contrario, el dolor neuropático (“patológico”) se relaciona con la alteración en el procesado de información somatosensorial a nivel del SNC y -P (International Association for the Study of Pain (IASP); Merskey y Bogduk, 1994). Este tipo de dolor, sumamente debilitante, representa en la actualidad un problema de gran complejidad, así como difícil y costoso tratamiento en los servicios hospitalarios de todo el mundo (John, 1999; Jensen et al., 2001; Goucke, 2003; Harden y Cohen, 2003; Jensen y Baron, 2003). El dolor neuropático, iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso (Merskey y Bogduk, 1994) suele ser persistente aún cuando el efecto causal hubiera desaparecido, se caracteriza por ser crónico, refractario al tratamiento con analgésicos (Orza et al., 2000), no resolver con el tiempo y ser en muchas oportunidades extremadamente debilitante (Suzuki y Dickenson, 2000; Meyer-Rosberg et al., 2001a, b).



**Tabla I.2.** Descripción de terminología técnica (Tomado de Millan, 1999).

**Table I.2.** Description of technical terminology (Taken from Millan, 1999).

Este tipo de dolor se asocia también a sensaciones anormales como alodinia, hiperalgesia y anestesia dolorosa (ver Tabla I.2) (Wall et al., 1979; Levitt, 1985; Fields et al., 1999; Scadding, 1999).

La etiología del dolor neuropático es muy variada: en **pacientes diabéticos** se observa una neuropatía distal simétrica que se extiende proximalmente (Ziegler et al., 1988); en otros casos, las infecciones por **virus** Herpes Zoster (Rowbotham y Fields, 1996) o HIV (O'Neill y Sherrard, 1993) pueden inducir dolor crónico. También, lesiones graves del SNC tales como el dolor post-infarto cerebral (Bowsheer, 1996; 1998), la esclerosis múltiple (Österberg et al., 1994) o lesiones de la médula espinal (Beric et al., 1988; Yeziarski, 1996) inducen dolor. Finalmente, la **lesión directa de un nervio periférico**, por ejemplo en el síndrome del túnel carpiano con compresión del nervio mediano, es causal de neuropatía y dolor crónico. En particular las lesiones de atrapamiento nervioso inducen alteraciones en el flujo sanguíneo intraneural, la formación de edema, la inhibición del transporte axonal, todo esto acompañado de cambios estructurales diversos que inducen el deterioro de la función del nervio (Rempel et al., 1999).

Actualmente, la clasificación de los distintos tipos de dolor en base a la etiología involucrada está siendo redefinida en base a los mecanismos subyacentes más que a la etiología causante, ya que diferentes patologías pueden desencadenar signos y síntomas de dolor neuropático similares, o una misma enfermedad puede presentar cuadros dependientes de cada paciente (Baumgartner et al., 2002).

**Modelos animales de dolor neuropático.** En los últimos 20 años, se han desarrollado numerosos y variados modelos animales para el estudio del dolor crónico generado por neuropatía periférica (Bennett y Xie, 1988; Seltzer et al., 1990; Gazelius et al., 1996;

Kim et al., 1997; Kupers et al., 1998; Decosterd y Woolf, 2000). La injuria por compresión crónica (ICC) del nervio ciático (Bennett y Xie, 1988) y la axotomía (Wall y Gutnick, 1979; Wall et al., 1979) son dos ejemplos de modelos extensamente utilizados. Estos, inducen cambios drásticos en el fenotipo de las neuronas sensoriales primarias, probablemente relacionados con mecanismos de supervivencia, pero que podrían constituirse en fundamento del dolor generado por la lesión (Hökfelt et al., 1994a). En este contexto, y haciendo uso de varios de estos modelos, se han descrito cambios dramáticos en la expresión del NPY, la Gal y sus respectivos receptores (Hökfelt et al., 1994a, b; 1998b).

**Ganglio Anexo a la Raíz Dorsal**

**Raíz Dorsal  
(Proyección Central)**

Fibra no miélnica (C)

**Nervio Ciático  
(Proyección Periferica)**

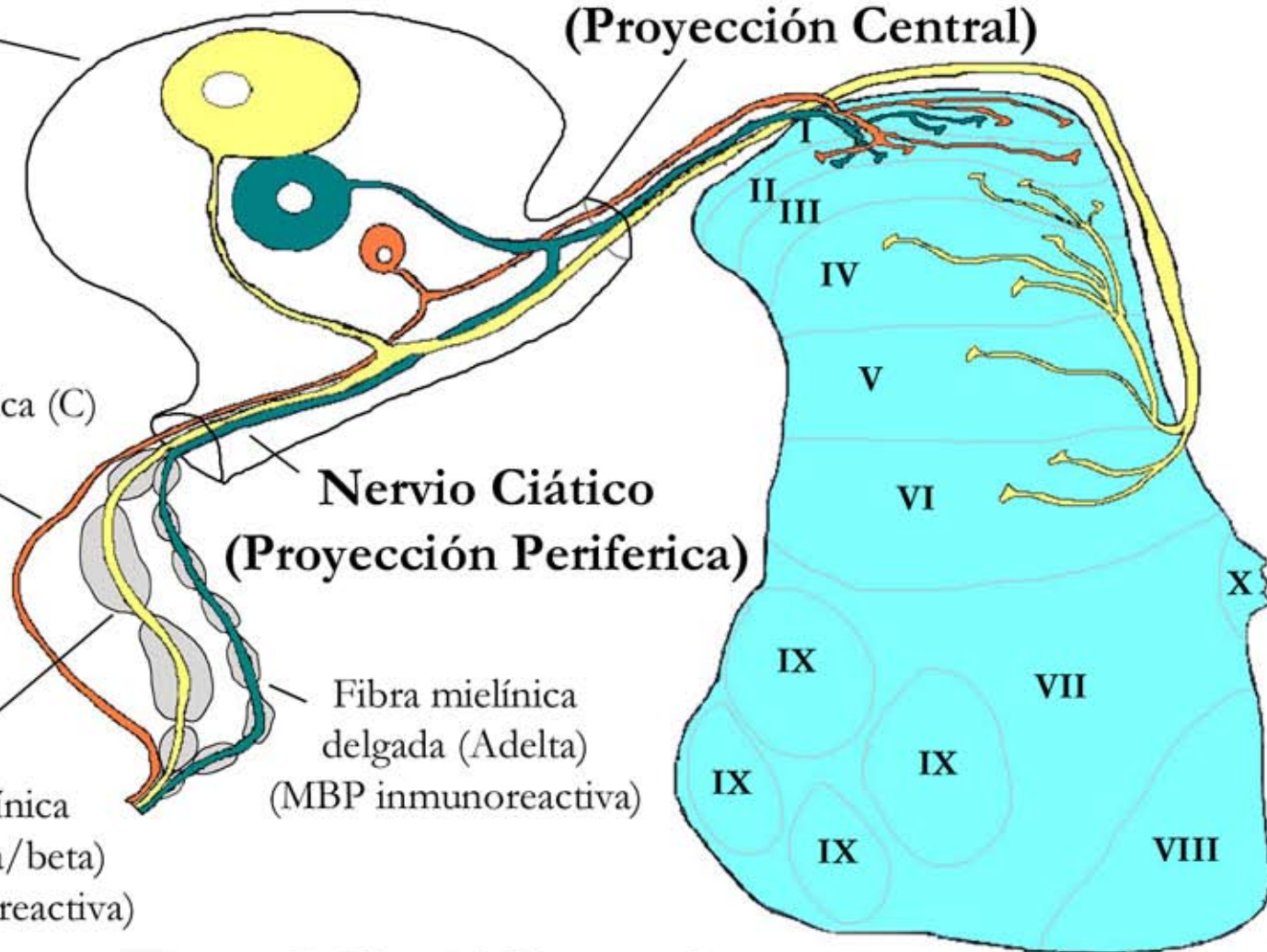
Fibra miélnica  
gruesa (Aalfa/beta)  
(MBP inmunoreactiva)

Fibra miélnica  
delgada (Adelta)  
(MBP inmunoreactiva)

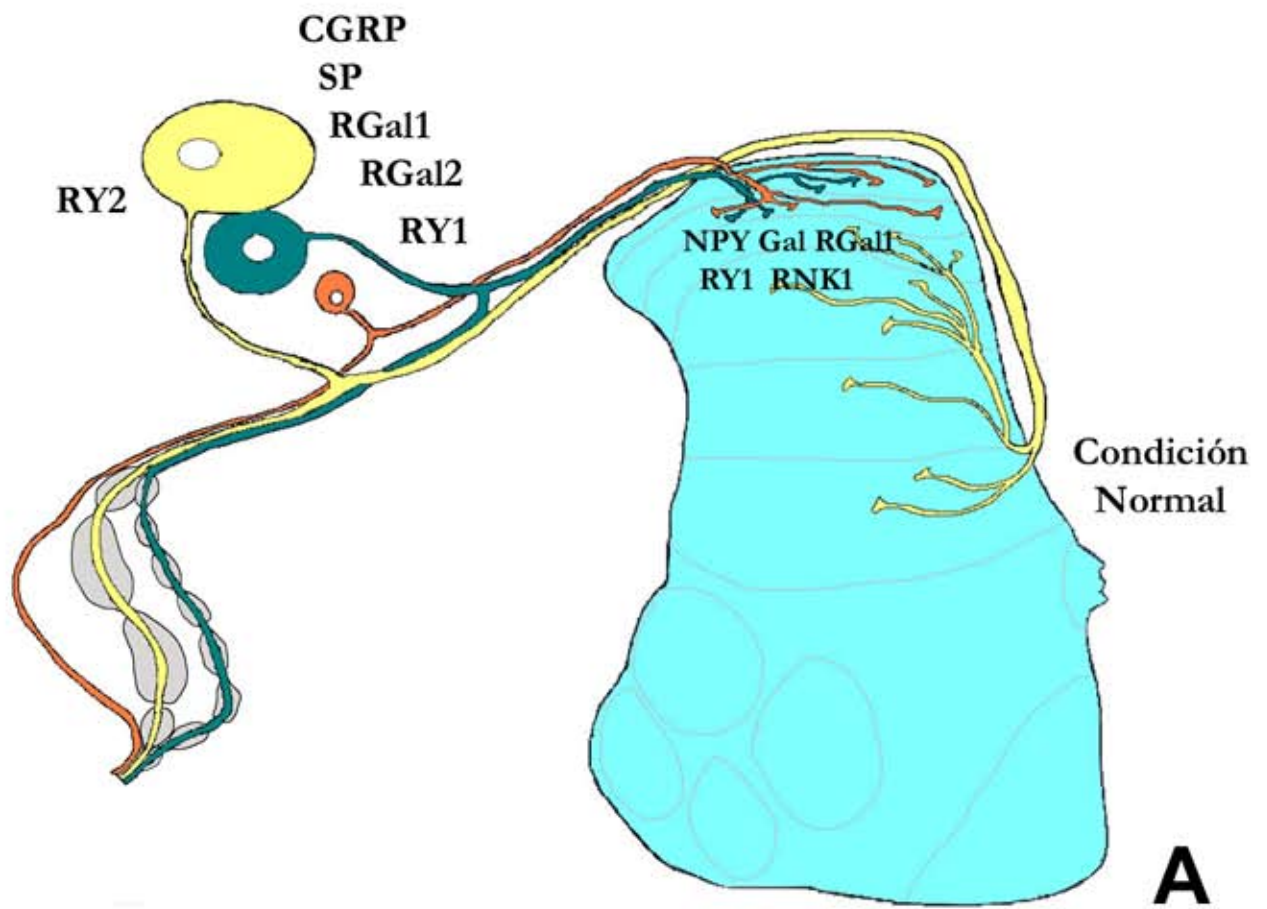
**Asta  
Dorsal**

**Asta  
Ventral**

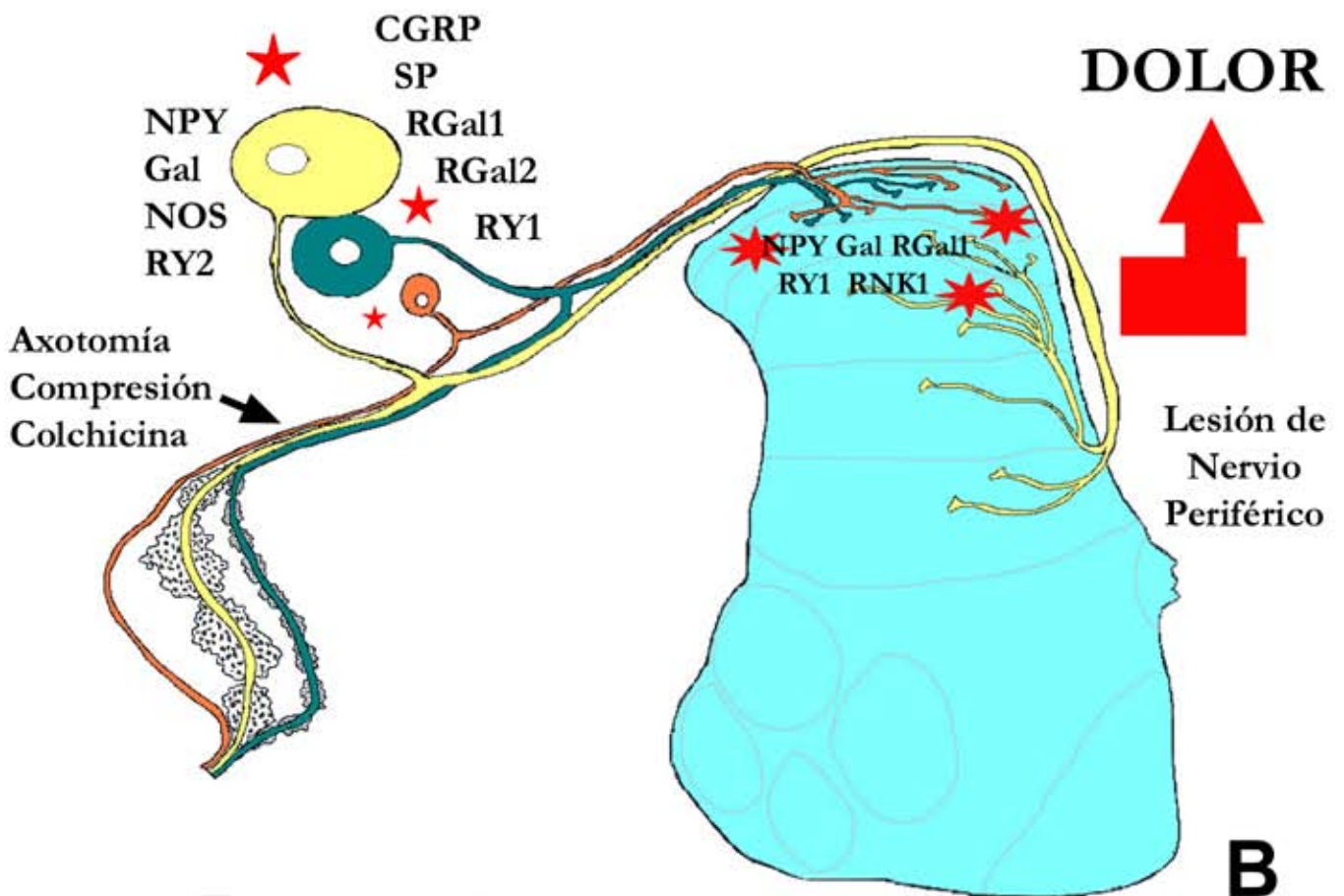
**Nivel Lumbar**



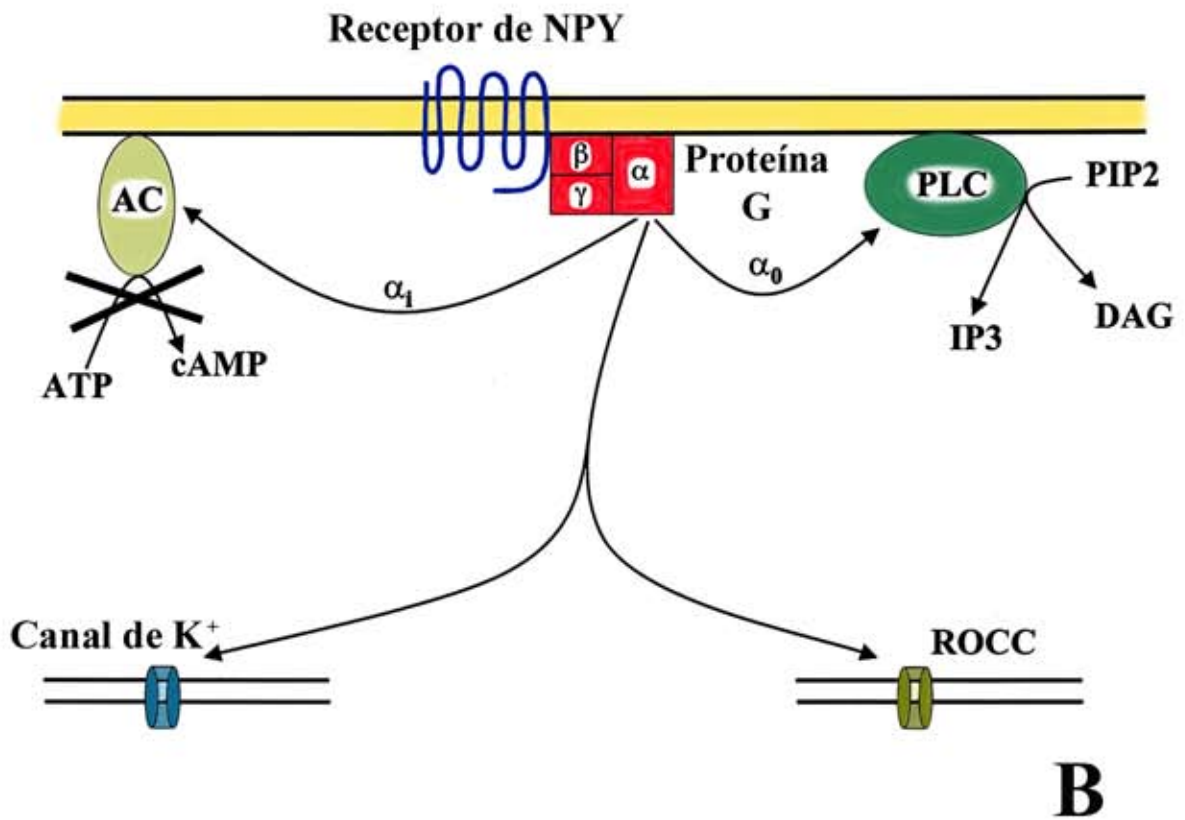
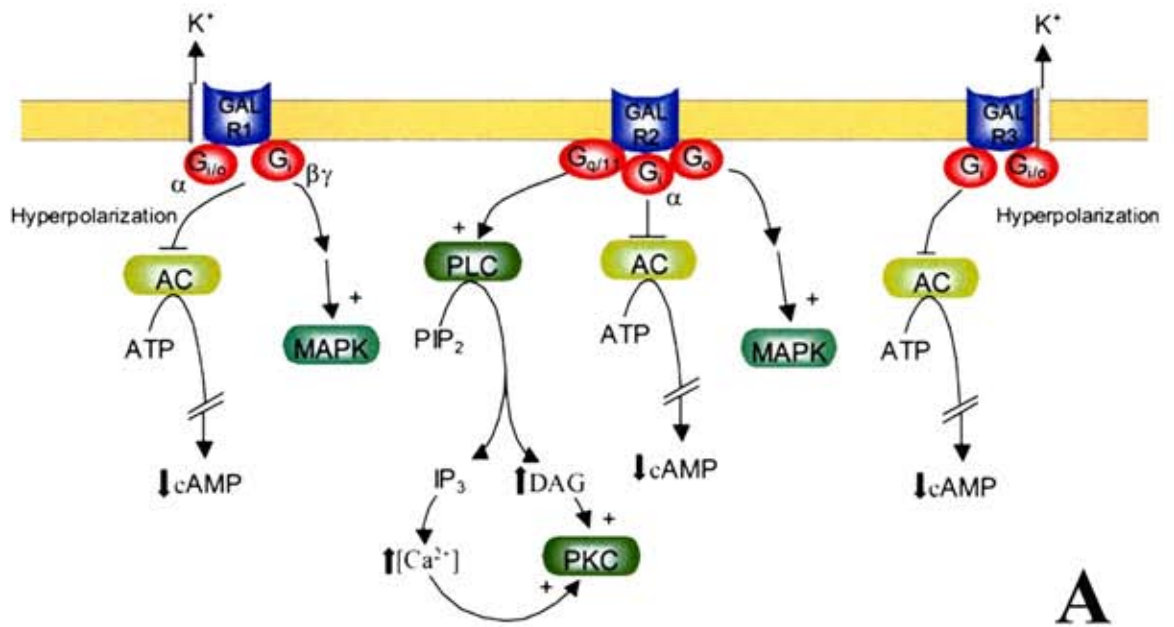
Modalidad	Tipos de receptor periférico	Tipo de fibra	Tipo de Célula	Umbral de activación	Neurotransmisor principal	Tipos de receptor para neurotransmisores	Láminas del asta dorsal inervadas	Tipo de neuronas espinales inervadas	Velocidad de conducción (m s <sup>-1</sup> )	Sensibilidad mediada	
										Fisiológica	Patológica
Mecanoccepción (Nocicepción?)	Discos de Merkel	Aβ	Grande (Clara)	Bajo	AAEs	AMPA	III-VI	No-NC WDR	42-72	Presión, forma, textura	Alodinia Mecánica (Dolor)
	Corpúsculos de Meissner	Aβ								Roce, vibración de baja frecuencia	
	Ruffini,	Aβ								Estiramiento de la piel?,	
	Paccini	Aβ								Vibración	
Termocepción	Terminaciones libres	C	Pequeña (oscura)	Alto	SP/NKA CGRP AAE	NK1/2 CGRP1/2 NMDA/AMPA MGlu	I/IIo IV-VI, X	NC WDR	0.5/1.2	Calor	Hiperalgnesia Alodinia termoalgésica (Dolor)
	Terminaciones libres	Aδ (II)	Mediana (clara)	Alto (sujeto a sensibilización)						I/IIo, IV	
Nocicepción	Terminaciones libres	Aδ (I)	Mediana (Clara)	Alto (sujeto a sensibilización)	SP/NKA CGRP AAE	NK1/2 CGRP1/2 NMDA/AMPA MGlu	I/IIo, IV	NC, No-NC, WDR	12-36	Dolor Agudo	Hiperalgnesia Alodinia termoalgésica (Dolor)
	Terminaciones libres (receptores polimodales)	C	Pequeña (oscura)	Alto						I/IIo IV-VI, X	



**A**



**B**



<b>Alodinia</b>	-dolor evocado por un estímulo normalmente inocuo. Desde el punto de vista operacional, una respuesta a un estímulo inocuo y que normalmente solo se obtendría con un estímulo doloroso (algunas autoridades consideran a la alodinia como un "extensión" de la hiperalgesia hacia la izquierda de la respuesta a un estímulo)
<b>Analgésia (antinocicepción)</b>	-una reducción en el dolor "espontáneo", o del dolor inducido por un estímulo doloroso. Desde el punto de vista operacional, una respuesta reducida, o el incremento en el umbral de respuesta, a un estímulo doloroso
<b>Autotomía</b>	-el acto de mutilación de una parte del cuerpo luego de axotomía
<b>Axotomía</b>	-sección completa de un axón/nervio
<b>Dolor neuropático</b>	-dolor debido a la disfunción de, o el daño a, un nervio o grupo de nervios. Primariamente periférico, aunque el dolor ocasionado por daños a nivel del sistema nervioso central (dolor "central") también es considerado en esta categoría
<b>Dolor nociceptivo</b>	-dolor debido a una excesiva estimulación de nociceptores ubicados en piel, vísceras y otros órganos
<b>Dolor</b>	-sensación sensorial y emocional no placentera asociada al riesgo actual o potencial de daño tisular
<b>Estímulo doloroso o nociceptivo</b>	-un estímulo actual o potencialmente dañino
<b>Hiperalgesia</b>	-un incremento en el dolor inducido por un estímulo doloroso. Desde el punto de vista operacional, una respuesta incrementada, o una disminución del umbral de respuesta, a un estímulo doloroso. También, "dolor espontáneo" sin participación de un estímulo externo
<b>Nociceptor</b>	-receptores sensibles a estímulos nocivos, ubicados en la periferia
<b>Allodynia</b>	-pain evoked by a normally innocuous stimulus. Operationally-defined in terms of a response to an innocuous stimulus which is normally only evoked by a noxious stimulus (Some authorities consider allodynia an "extension" of hyperalgesia at the left of the stimulus-response function)
<b>Analgésia (antinocicepción)</b>	-a reduction in "spontaneous" pain, or the pain elicited by a noxious stimulus. Operationally-defined in terms of a reduced response to, or an increase in the threshold to respond to, a noxious stimulus
<b>Autotomy</b>	-the act of casting off or mutilating a body part following axotomy
<b>Axotomy</b>	-complete transection of an axon/nerve
<b>Hiperalgesia</b>	-an increase in the pain elicited by a noxious stimulus. Operationally-defined in terms of an increased response to, or a decrease in the threshold to respond to, a noxious stimulus. "Spontaneous" pain occurs in the apparent absence of extraneous stimulation
<b>Neurogenic pain</b>	-pain due to a dysfunction of, or damage to, a nerve or group of nerves. Primarily peripheral nerves, although pain due to CNS damage ("central" pain) may share these characteristics
<b>Nociceptive pain</b>	-pain due to excessive stimulation of nociceptors localized in the skin, viscera and other organs
<b>Nociceptor</b>	-a peripherally-localized receptor sensitive and responding to noxious stimulus
<b>Noxious stimulus</b>	-a damaging, or potentially damaging, stimulus
<b>Pain</b>	-unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage



# Capítulo II

## Materiales y Métodos

## **Animales**

Siguiendo las indicaciones de la Society for Neuroscience (SFN) y la International Association for the Study of Pain (IASP) para el uso de animales en investigaciones del Sistema Nervioso, se utilizaron los siguientes roedores:

- ratas Wistar macho, entre 250 y 300 gramos de peso (**Capítulo V**)
- ratas Sprague-Dawley macho, entre 250 y 300 gramos de peso (**Capítulos V-VIII; X**)
- ratones C57Bl/6 macho, entre 25 y 30 gramos de peso (**para características genéticas especiales, ver Capítulos VIII, IX**)

Todos los animales fueron mantenidos en un ciclo día/noche de 12 horas, con acceso *ad libitum* a comida y agua. Previo a cualquier intervención quirúrgica o la perfusión transcardíaca, los animales fueron anestesiados usando pentobarbital (Mebumal; 60 mg/kg., ip.). Además, todas las lesiones practicadas fueron aprobadas por los comités éticos sueco (Stockholms Norra Djurförsöksetiska Namd) (#206/99) y de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (#24/03).

## **Modelos de lesión del nervio ciático y raíces dorsales (Capítulos V-VII; IX)**

En la presente tesis, fueron practicados diferentes modelos de lesión de nervios periféricos, así como también de las raíces dorsales:

- 1) ***Axotomía del nervio ciático (Fig. II.1a)***. Luego de exponer y disecar el nervio del tejido circundante a la altura de la mitad del fémur de la pata de la rata, el mismo fue

**Fig. II.1.** Dibujos esquemáticos de los diferentes tipos de lesión del nervio ciático utilizados en la presente tesis. (A), axotomía; (B) modelo de Bennett (ICC) y (C) CUNP.

**Fig. II.1.** Schematic drawings of the different types of lesion of the sciatic nerve used in the present thesis. (A), axotomy, (B) Bennett model (CCI) and (C) SLNC.

completamente seccionado, distalmente a una ligadura permanente practicada previamente. Para evitar cualquier posibilidad de re-unión de los dos extremos, se extrajeron 5 mm del segmento distal a la sección.

- 2) ***Injuria por compresión crónica (ICC), Modelo de Bennett (Fig. II.1b)***. El nervio ciático, expuesto y liberado del tejido circundante, fue ligado de acuerdo con lo descrito por Bennett y Xie en 1988, con 4 ligaduras suaves a la altura de la mitad del fémur de la pata de la rata.
- 3) ***Compresión Unica de Nervio Periférico (CUNP) (Fig. II.1c)***. El nervio ciático fue expuesto como fuera detallado más arriba, envuelto en un delgada lámina de polietileno, y su diámetro reducido usando una sola ligadura permanente y con un grado determinado de compresión. Se obtuvieron así tres grupos principales de ratas lesionadas: CUNP ‘intensa’ ( $\geq 90\%$  del diámetro del nervio), ‘media’ (40-80% del diámetro del nervio) y ‘suave’ (10-30% del diámetro del nervio).
- 4) ***Rizotomía dorsal***. La médula espinal lumbar fue expuesta por laminectomía de los últimos segmentos vertebrales lumbares, y las raíces dorsales desde Lumbar 1 (L1) hasta Sacra 3 (S3) fueron seccionadas unilateralmente para obtener una interrupción completa de las aferencias primarias a las astas dorsales de la médula espinal.
- 5) ***Compresión transitoria (crush) del nervio ciático***. Luego de disecado, el nervio fue tomado entre las ramas de un par de fórceps finos y comprimido por espacio de 30 segundos con la máxima intensidad posible. Posteriormente, el nervio fue liberado y las incisiones hechas en piel, suturadas.

## **Procedimientos Farmacológicos (Capítulo VI)**

*Cateterización intratecal.* Se implantó bajo la acción de anestesia un catéter intratecal (PE 10, diámetro externo 0.61 mm) entre las vértebras L5-6 en ratas naïve o con compresión de Bennett de 7 días de evolución, ubicando el tip en la zona de ensanchamiento lumbar (L3-4). La implantación fue controlada por medio del test de lidocaína, 24 hs previas a los experimentos farmacológicos.

*Implantación de minibombas osmóticas.* En varios animales cateterizados se implantaron minibombas osmóticas (Alzet, modelo 2002, 0.5 µl/h) en el tejido celular subcutáneo, las cuales se conectaron al catéter intratecal. Cada minibomba contuvo una mezcla de vehículo o agonistas para receptores galaninérgicos diluïdos en cloruro de sodio 0.9% estéril en concentraciones equimolares. Las soluciones fueron administradas a una velocidad constante.

## **Preparación de las muestras**

*Fijación y criopreservación.* Todos los animales destinados a estudios de inmunohistoquímica fueron anestesiados y perfundidos a través del corazón, primero con 50 ml de buffer Tyrode a 37°C, seguido de 50 ml de una mezcla de 4% de paraformaldehído y 0.2% de ácido pícrico disueltos en buffer fosfato 0.16 M (BF) (pH 6.9) (Pease, 1962; Zamboni y De Martino, 1967) a 37°C, y luego 300 ml del mismo fijador a 4°C. Los tejidos, rápidamente disecados, fueron sumergidos en el mismo fijador durante 90 minutos y posteriormente en sucrosa al 10-20% disuelta en buffer fosfato salino (PBS) (pH 7.2), conteniendo además 0.01% de azida sódica (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) por no menos de 24 h. Los tejidos fueron cortados en un crióstato (Microm, Heidelberg, Germany) con distintos grosores, dependiendo de las necesidades de cada

experimento y el tejido pertinente, y montados en portaobjetos gelatinizados con gelatina y alumbre de cromo.

## **Análisis inmunohistoquímico de los tejidos**

### Inmunohistoquímica sobre secciones finas de tejido

*Inmunorreacción coloreada con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Hsu et al., 1981) (Capítulo V).* Las secciones fueron incubadas en una cámara húmeda a 4°C durante 24 h con los correspondientes anticuerpos primarios generados en conejo (Ver Tabla II.1: tabla de anticuerpos primarios y secundarios). Luego, las secciones fueron incubadas a temperatura ambiente (TA) por 60 min con un anticuerpo secundario anticonejo (Tabla II.1). Finalmente, las secciones se incubaron con los reactivos ABC del Kit de Vector “Elite” (Vector Laboratories) por 1 h a TA. La actividad de la peroxidasa fue demostrada a través de la reacción con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), usando el protocolo de la diaminobenzidina amplificada con nickel, para aumento del producto de inmunoreacción. Luego de ser deshidratadas, las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos montados con Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey, USA).

Para el análisis de las secciones se utilizó un fotomicroscopio Nikon Eclipse E800 dotado de iluminación de campo claro. Para la toma de fotos se usó film fotográfico Technical Pan (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA.).

**Tabla II.1.** Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la presente tesis.

**Table II.1.** List of primary and secondary antibodies used in the present thesis.

*Inmunofluorescencia amplificada por tiramida indirecta (TSA plus) (Adams, 1992) (Capítulo VIII).* Las secciones fueron procesadas usando el método de deposición catalizada del receptor (Adams, 1992) y un kit comercial [amplificación indirecta de la señal de tiramida (TSA); NEN Life Science Products, Boston, MA, USA]. En breve, las secciones fueron rehidratadas en PBS, pretratadas con 0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos a temperatura ambiente (TA), e incubadas con el anticuerpo primario diluído en una cámara húmeda por 24 horas a 4°C. Luego de lavar las secciones en buffer TNT (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) por 10 minutos, las mismas fueron incubadas en buffer TNB (kit; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% del Reactivo Bloqueante DuPont; NEN) por 30 minutos a TA y luego incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa del rábano picante (Dako, Copenhagen, Dinamarca) diluído 1:100 en buffer TNB por 30 minutos. Posteriormente, las secciones fueron lavadas tres veces de 10 minutos cada una en buffer TNT e incubadas con tiramida biotinilada (NEN) diluída 1:100 en diluyente de amplificación por 16 minutos; todos los pasos fueron a TA. Luego de lavar tres veces más en buffer TNT, la detección cromogénica del depósito de la biotina fue llevada a cabo por medio de la incubación con un conjugado de FITC y streptavidina (NEN), diluído 1:100 en buffer TNB, por 30 minutos a TA. Finalmente, las secciones fueron lavadas en buffer TNT.

En algunos casos, se practicó inmunohistoquímica de doble tinción (Ver más adelante y el Capítulo VIII). Todas las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos usando una mezcla de glicerol y PBS (9:1) conteniendo 0.1% de parafenilenediamina (Sigma).



***Inmunofluorescencia amplificada por tiramida (TSA plus) (Adams, 1992) (Capítulo VII, IX, X).*** Las secciones fueron incubadas durante 24 hs en una cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Durante el segundo día, varios lavados e incubaciones en TNT y TNB (soluciones provistas por el kit comercial de TSA plus, NEN™ Life Science Products, Inc.; Boston, MA, USA) fueron realizados. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con un conjugado de anticuerpo secundario-peroxidasa del rábano picante (Dako, Glostrup, Denmark) diluído en TNB y posteriormente incubadas con otro conjugado de tiramida y fluoresceína (FITC), diluído en diluyente de amplificación (kit) durante 10-30 min. Finalmente, los portaobjetos fueron lavados en TNT y montados con glycerol/PBS (9:1) conteniendo 0.1 % de *para*-phenylenediamine (Johnson y Nogueira Araujo, 1981; Platt y Michael, 1983) ó DABCO al 2.5% en glicerol (Sigma).

***Doble y Triple inmunofluorescencia indirecta (Capítulos VII-X).*** Experimentos de doble y triple tinción fueron llevados a cabo usando anticuerpos generados en distintas especies (ver tabla II.1), y en varias ocasiones inmediatamente después del procesado de algún anticuerpo primario por la técnica de tiramida (Gal y el RY1). En algunas oportunidades, se procedió a la incubación y procesado del anticuerpo primario de elección para la técnica de tiramida, seguido de la incubación con lo/s otros anticuerpos y su posterior detección por inmunofluorescencia indirecta. En otras, primero se practicó la incubación del tejido con todos los anticuerpos primarios a analizar, ya fuera a modo de mezcla de dos o tres de ellos, o por incubaciones sucesivas, para luego ser procesados por TSA y posteriormente por inmunofluorescencia indirecta. Todos los tiempos de incubación fueron no menores de 24 hs y hasta de 72 hs.

Los anticuerpos procesados por inmunofluorescencia indirecta fueron incubados con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con Lisamina Rodamina (LRSC), Rodamina Roja X, Rojo de Texas, Cyanina 3 (Cy3) ó Cyanina 5 (Cy5) (ver cada capítulo para las concentraciones).

Las secciones con inmunofluorescencia fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot-FX o un microscopio Eclipse E600 dotado de una cámara digital Nikon (Nikon DXM 1200, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan) y filtros adecuados para la observación de los diferentes fluoróforos utilizados. Se tomaron fotografías blanco y negro con film Kodak T-400 o con la cámara digital Nikon.

Para el análisis de las secciones también se utilizó un microscopio de escaneado confocal Biorad Radiance Plus (Biorad, Hemel Hempstead, UK) instalado sobre un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (Tokyo, Japan) equipado con objetivos de 10 aumentos (x) (0.45 N. A.), 20 x (0,75 N. A.) y 60 x de aceite (1,40 N. A.). Para la detección de la señal producida por cada fluoróforo, se utilizaron diferentes filtros (ver capítulos VII-X para una descripción más detallada). Se tomaron secciones ópticas de grosor variable entre 0.10 y 1  $\mu\text{m}$ . Todas las secciones fueron analizadas separadamente y luego mezcladas para mostrar la posible colocalización.

### Inmunohistoquímica por flotación (Capítulo X)

Se obtuvieron secciones parasagittales de la médula espinal de 50  $\mu\text{m}$  de espesor en un crióstato (Microm) que fueron inmediatamente sumergidas en PBS. Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes, entre 24 y 72 hs. En las ocasiones en que fuera necesario, un segundo y/ó tercer anticuerpo fue aplicado a las secciones, previo lavado en PBS. La incubación con más de un anticuerpo primario fue

secuencial (doble y triple tinción), con ciclos de 24 a 48 horas de incubación por cada anticuerpo, y en pocas oportunidades se mezclaron dos anticuerpos primarios en una misma solución. Posteriormente, uno de los anticuerpos (RY1) fue procesado usando la técnica de amplificación de la tiramida (TSA plus). Para la visualización de los otros anticuerpos primarios, las secciones fueron incubadas con anticuerpos secundarios apropiados, conjugados con diferentes fluoróforos. Los tiempos de incubación y lavados se ajustaron a las necesidades de la técnica de inmunohistoquímica por inmersión (ver Capítulo X para una descripción más detallada).

### Controles

Se practicaron incubaciones paralelas de secciones con los anticuerpos primarios, prebloqueados con los péptidos correspondientes, a una concentración de  $10^{-5}/10^{-6}$  M. Además, algunas secciones fueron incubadas sólo con anticuerpos primarios o secundarios y procesados con las técnicas de inmunohistoquímica indicadas más arriba.

### **Hibridación *in situ* (Dagerlind et al., 1992) (Capítulos IX, X)**

Se utilizaron sondas complementarias para los nucleótidos 152-199 y 546-585 del ARNm de rata para Gal (Vrontakis et al., 1987) y el RY1 (Eva et al., 1992), respectivamente, marcados con  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -dATP (Gal) o  $^{35}\text{S}$ - $\gamma$ -dATP (RY1) (New England Nuclear, Boston, MA, USA) en el extremo 3', usando la enzima deoxynucleotidyltransferasa (Amersham, UK) en un buffer de  $\text{CoCl}_2$  10mM, Tris base 1 mM, y cacodylato de potasio 1.4 mM (pH 7.2). Las sondas marcadas fueron purificadas usando microcolumnas de purificación ProbeQuant G50 (Amersham, UK). En el caso de la sonda para el RY1, se agregó dithiothreitol (DTT; LKB, Bromma,

Sweden) a una concentración final de 10 mM. La actividad específica de las sondas marcadas fue de  $1-4 \times 10^6$  cpm/ng de sonda.

Todos los animales procesados fueron sacrificados por decapitación. Los GARDs L5 contra- e ipsilateral a la lesión y médula espinal lumbares de ratas y ratones Wt y Gal sobreexpresantes (GalSE), así como los ganglios simpáticos supracervicales (GSS) de ratones Wt y GalSE fueron rápidamente disecados y congelados en hielo seco. Posteriormente, los tejidos fueron cortados a 14  $\mu\text{m}$  y montados en portaobjetos ProbeOn (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Las secciones a hibridar fueron secadas a TA en una campana de extracción durante una noche y luego incubadas con la sonda respectiva (0.5 ng) por 16-18 h a 42°C, diluidas en un cocktail de hibridación compuesto por formamida deionizada al 50% (G.T. Baker Chemicals BW, Deventer, The Netherlands), SSC 4X (SSC 1X= C1Na 0.15 M y citrato de sodio 0.0015 M), solución de Denhardt 1X (0.02% de polyvinylpyrrolidona; albúmina bovina y Ficoll); Sarkosyl al 1% (N-Lauryl Sarcosine; Sigma, St. Louis, Mo, USA); dextrán sulfato al 10% (Pharmacia, Uppsala, Sweden), DNA denaturalizado de testículo de salmón (Sigma) a una concentración de 500 mg/l y buffer fosfato 0.02M (pH 7.0). En el caso de la sonda para el RY1, se agregaron 200 mM de DTT.

Después de la hibridación, las secciones fueron lavadas con SSC 1X a 55°C, cuatro veces de 15 min cada una, seguido de un lavado de 1h a TA, rápidamente deshidratadas y secadas a TA en una campana de extracción. Los portaobjetos fueron sumergidos luego en la emulsión fotográfica líquida NTB2 (Kodak, Rochester, NY, USA). Cumplido el tiempo de exposición apropiado (2 días a 6 semanas), las secciones fueron reveladas usando la solución Kodak D19 y fijadas con el fijador Kodak 3000. Estos portaobjetos fueron montados con cubreobjetos usando glicerol y observados al

microscopio para su análisis en campo oscuro. En un paso posterior, y en caso de ser necesario, las secciones fueron desmontadas, contrateñidas con azul de toluidina y remontadas con cubreobjetos usando Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey, USA) para su posterior visualización por campo claro.

Las secciones fueron examinadas usando un microscopio Nikon Eclipse E800 equipado con un condensador de campo oscuro e iluminación de epi-polarización. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon DN-100 montada al microscopio Nikon Eclipse.

### **Procesado digital de las imágenes**

Todas las imágenes digitales obtenidas con cámara digital, microscopio confocado ó digitalizadas desde films fotográficos usando un scanner Nikon LS-2000 (Tokyo, Japan), fueron optimizadas para resolución de la imagen, brillo y contraste usando el programa Adobe PhotoShop 5.0/7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA). Las imágenes no fueron modificadas por adición o sustracción de ningún detalle. Finalmente, varias imágenes fueron impresas usando una impresora Epson Stylus™ Photo EX (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan).

### **Conducta dolorosa**

*Test de von Frey* (Capítulo V, VI). Los tests de conducta fueron realizados durante el día (9.00-18.00 hs) en una habitación tranquila. Los animales fueron ubicados en cubículos transparentes (8×8×18 cm) apoyados sobre un alambre tejido (tamaño del orificio, 3×3 mm) fijado a una caja de madera. Luego de 15 a 30 min de adaptación, una serie de filamentos de Von Frey (0.88, 1.28, 2.7, 5.1, 7.5, 8.8, 13.5, 23 g) (Stoelting,

**Fig. II.2.** Dibujos esquemáticos del método de von Frey para evaluación de la sensibilidad al estímulo mecánico (A) y estadificación de la autotomía en roedores (B). Notar la importancia del arqueado del filamento al tomar contacto con la pata testada para inducir la presión apropiada (A).

**Fig. II.2.** Schematic drawings of the von Frey method, used for the evaluation of the sensitivity to a mechanical stimulation (A) and autotomy score in rodents (B). Note the bending effect achieved with a certain filament in order to induce the appropriate pressure (A).

WoodDale, Illinois, USA) fueron aplicados secuencialmente desde el más suave hasta el más fuerte, y desde abajo hacia el centro de la superficie plantar de la pata posterior del animal para evaluar la alodinia mecánica (Chaplan et al., 1994) (Fig. II.2a). Cada filamento fue aplicado tres veces con intervalos de aproximadamente 5s. La retirada brusca de la pata fue tomada como una respuesta positiva para dolor. El mismo proceso fue repetido tres veces para cada pata contra- e ipsilateral, con 5 minutos de espera entre pata estudiada. Se determinó el umbral de dolor en base a la menor fuerza con la que se indujera una respuesta positiva en las tres estimulaciones aplicadas. Asimismo, se consideró umbral de dolor en rango alodínico, aquel obtenido con 5.1 g o menos de fuerza. El límite máximo de fuerza de los pelos utilizados fue de 23 g (cuando el pelo fuera capaz de levantar la pata de la rata).

***Test de sensibilidad al frío (Capítulo V, VI).*** Se utilizó una gota de acetona aplicada al talón de la pata de la rata, con inmediata dispersión de la solución y la generación de un estímulo frío (Choi et al., 1994). La retirada brusca de la pata fue tomada como un resultado positivo (1) mientras que su ausencia fue considerada negativa (0). El proceso se repitió por 5 veces, con intervalos de 5 minutos para cada pata y se estableció un rango de 0 a 5 para definir el grado de sensibilidad al frío.

***Autotomía (Capítulo V, VI).*** La autotomía fue ranqueada de acuerdo a una escala de 1 a 11, descrita por Wall y cols. (1979) (ver Fig. II.2b).

Luego de los experimentos conductuales, todos los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital y sacrificados por decapitación.

## Cuantificación

La cuantificación del efecto de diversas lesiones en la expresión de los marcadores neuronales estudiados en los GARDs fue llevada a cabo de dos maneras:

- En el **capítulo V** se contaron los PNs inmunoreactivos para NPY y RY1, usando un microscopio de campo claro dotado de un objetivo de 20 x. Los conteos fueron realizados en secciones de 16  $\mu\text{m}$  de grosor tomadas al azar en forma sistemática a lo largo de toda la extensión de cada GARD (cada 12<sup>ava</sup> sección, un total de 5-8 secciones por ganglio). El número total de PNs positivos para NPY y RY1 en cada ganglio fue luego correlacionado con la suma de las áreas de las distintas secciones utilizadas para la cuantificación. Así, se obtuvo el número de PNs positivos en 100,000 micrómetros cuadrados de área en los lados contra- e ipsilateral por cada rata, y se calculó el promedio  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.) por grupo para el análisis estadístico final.
- Para la cuantificación en el **capítulo IX**, se tomaron 10 secciones de 14  $\mu\text{m}$  de espesor de los GARDs de ratón procesados por inmunohistoquímica y separadas entre sí por dos secciones. El porcentaje de PNs Gal-IR fue determinado en los GARDs L5 después de 7 días de sobrevida a la lesión del nervio ciático, así como en animales control. En cada tercera sección de los GARDs, se practicó el conteo de PNs Gal-IR, así como el número total de PNs presentes en la misma sección teñida con Ioduro de Propidio (0,001%; Sigma), el cual marca ácidos nucleicos, dando un patrón de inmunofluorescencia similar a la tinción de Nissl, destacándose un núcleo fluorescente. El número total de PNs Gal-IR contados en los mismos fue luego dividido por el número total de PNs teñidos con Ioduro de Propidio en cada una de las secciones, obteniéndose un porcentaje para subsiguiente análisis estadístico. Las



secciones fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot-FX, usando un objetivo de 20 x.

- Para la estimación semicuantitativa de los tamaños celulares se utilizó una grilla cuadrículada aplicable a los oculares del microscopio, con un tamaño por cuadrado de 40 x 40  $\mu\text{m}$  (1600  $\mu\text{m}^2$ ). De este modo, se procedió a la separación de los distintos tamaños celulares en dos grupos principales: 1) neuronas pequeñas, que ocuparan un cuarto o poco más de área de un cuadrado ( $\approx 400 \mu\text{m}^2$ ), y 2) neuronas grandes y medianas, que ocuparan dos o más cuartos de área ( $\approx 800\text{-}1600 \mu\text{m}^2$ ).

## Estadística

En el **capítulo V**, las diferencias en el porcentaje de PNs positivos para el marcador deseado, entre los lados contra- e ipsilateral por cada grupo de tratamiento (Axo, CUNPs ‘intensa’, ‘media’, y ‘suave’), en cada sobrevida fueron testeadas usando el t-test pareado de Student. Por su parte, la comparación entre diferentes grupos a cada tiempo de sobrevida fue analizada usando el test de análisis de varianza (ANOVA), seguido del test Tukey HSD, cuando ANOVA diera un resultado significativo. Asimismo, en el **capítulo IX**, se utilizó el t-test no pareado de student para la comparación entre los diferentes grupos cuando el test ANOVA diera significativo, así como el t-test pareado para comparar los lados contra- e ipsilateral en un mismo grupo de animales.

Métodos no-paramétricos fueron empleados en el **capítulo V** para el estudio del efecto de las distintas lesiones del nervio ciático respecto de la conducta de dolor, usando el test de Wilcoxon (Matched Pairs), para la comparación entre lados contra- e ipsilateral; el test de Kruskal-Wallis para analizar los efectos de la lesión a cada sobrevida y, cuando este último diera significativo, el U test de Mann-Whitney, para

comparar los distintos tratamientos. En el **capítulo VI**, también fue usado el test Friedman ANOVA para la comparación entre grupos tratados respecto del tiempo, y Kruskal-Wallis, para la comparación entre distintos grupos a una sobrevivida determinada.

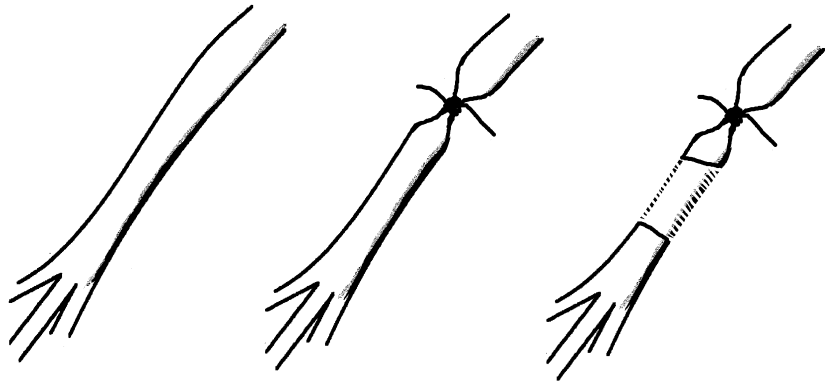
Los niveles de significancia, en todos los capítulos, se presentan como sigue: \*, #,

§ valor de  $(P) < 0.05$ , \*\*, ##, §§  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Nervio Ciático  
(no lesionado)**

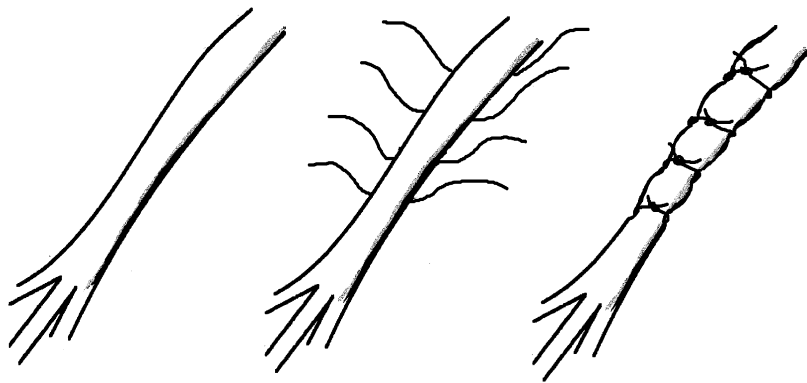
**Ligadura  
Extrema**

**Sección completa  
y resección (5 mm)**



**A**

**Compresión de Bennett**

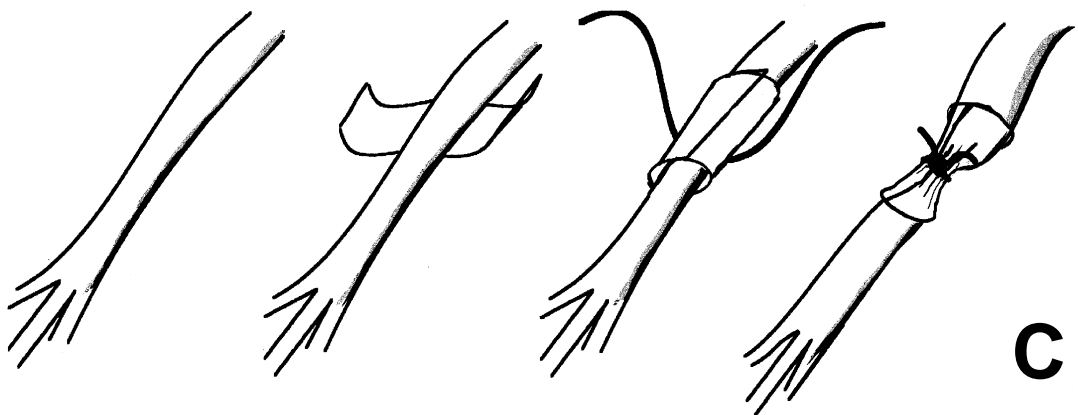


**B**

**Aplicación  
de lámina de  
polietileno**

**Aplicación  
de ligadura**

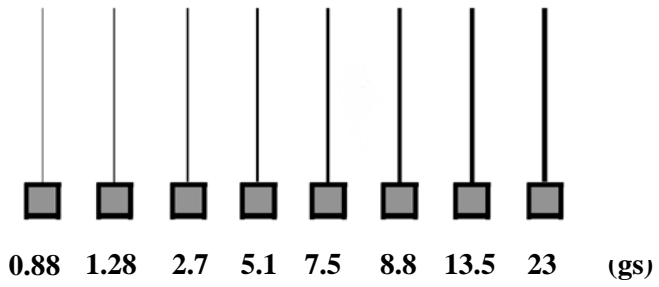
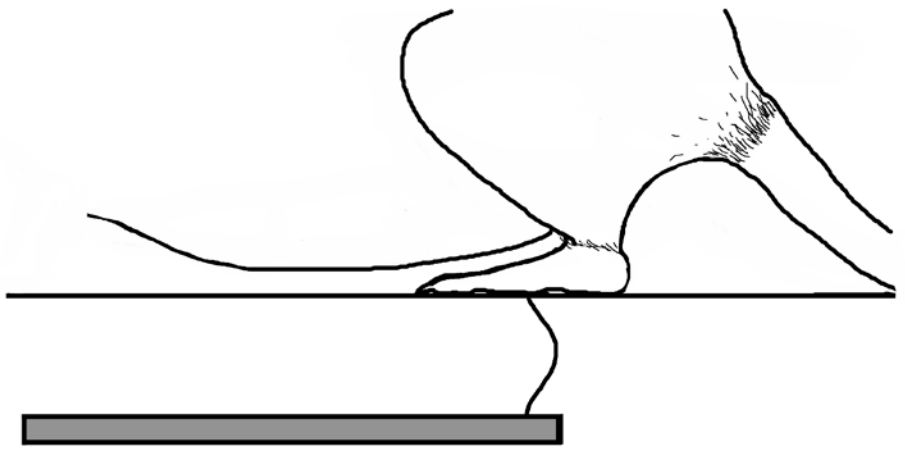
**Compresión  
de grado  
variable**



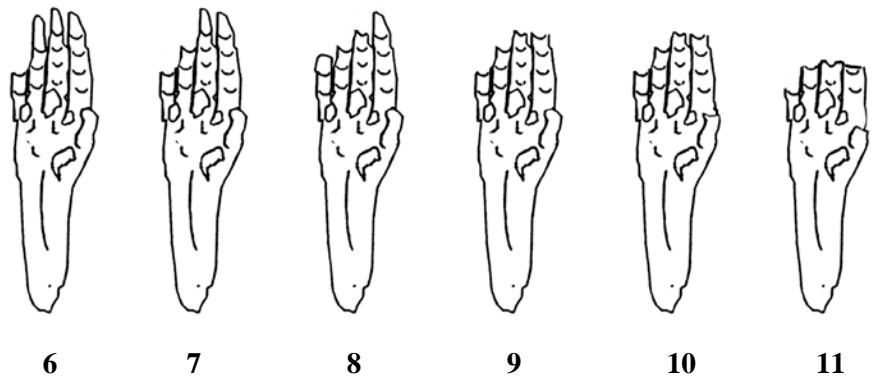
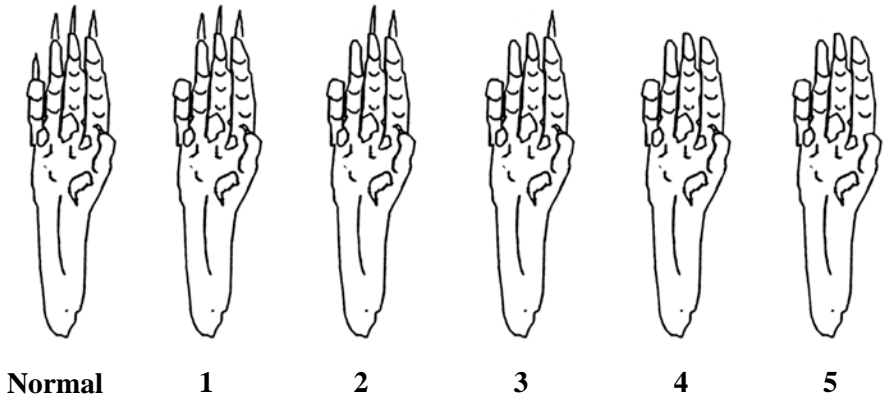
**C**

Neurotransmisor / Neurotransmitter	Especie de origen / Species of origin	Dilución / Dilution	Referencia / Reference
<b>Anticuerpos Primarios / Primary antibodies</b>			
Péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP)	Conejillo de Indias	1:400	Península Laboratories, Belmont, CA, USA
Galanina (Gal)	Conejo	1:4000	Theodorsson et al., 2000
Neuropéptido tyrosina (NPY)	Conejo	1:4000	Península Laboratories, Belmont, CA, USA
Neuropéptido tyrosina (NPY)	Ratón	1:400	Grouzman et al., 1992
Péptido relacionado al gen de la proteína 9.5 (PGP 9.5)	Ratón	1:100	Ultrasclone, Wellow, England
Feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT)	Oveja	1:600	Goldstein et al., 1971
Receptor Y1 del NPY (RY1)	Conejo	1:8000	Zhang et al., 1994b
Receptor Y1 del NPY (RY1)	Conejo	1:8000	Kopp et al., 2002
Serotonina (5HT)	Conejillo de Indias	1:400	<b>2232?</b>
Somatostatina (SOM)	Ratón	1:800	Wong et al., 1990
Tirosina hidroxilasa (TH)	Oveja	1:400	
Actina de músculo liso $\alpha$ ( $\alpha$ -SMA)	Ratón	1:400	Sigma
<b>Anticuerpos Secundarios / Secondary antibodies</b>			
Anti-conejo	Burro	1:100	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Anti-conejo + HRP	Idem	1:200	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-conejillo de indias (Rodamina)	Idem	1:80	Jackson, ImmunoResearch, WestGrove, PA, USA
Anti-ratón (Cy3)	Idem	1:80	Idem
Anti-oveja (Rodamina Roja)	Idem	1:80	Idem
Anti-conejo (Rodamina Roja)	Idem	1:80	Idem
Anti-oveja (Cy3)	Idem	1:400	Idem
Anti-ratón (Cy5)	Idem	1:100	Idem
Anti-ratón (Rojo de Texas)	Idem	1:100	Idem

**Burro:** Donkey; **Conejo:** Rabbit; **Conejillo de indias:** Guinea Pig; **Oveja:** Sheep; **Rata:** Rat; **Ratón:** Mouse



**A**



**B**

# Capítulo III

## Resultados y Discusión

## Neuropéptidos y el Dolor Crónico

Un número creciente de publicaciones confirma el papel de los neuropéptidos en los mecanismos del dolor. De hecho, “... se ha reconocido que los neuropéptidos participan en el procesado de información nociceptiva no sólo a nivel periférico y espinal, sino virtualmente en todos los niveles del SNC” (Hökfelt et al., 1994b).

Uno de los primeros neuropéptidos que se relacionó con los mecanismos del dolor fue la SP (Henry, 1976; 1994). Su secreción desde las terminales periféricas de neuronas aferentes primarias por inflamación neurogénica, produce una “sopa inflamatoria” (Lang et al., 1990; Handwerker y Reeh, 1991) que desencadena una serie de eventos, estimulando aún una mayor secreción peptidérgica desde terminales sensoriales, la degranulación de mastocitos (Lembeck y Gamse, 1982), vasodilatación y extravasación plasmática (Brain y Williams, 1985; 1988). Más recientemente, elegantes descripciones morfológicas (Nichols et al., 1999; Todd et al., 2000) y funcionales implican a la SP ( Nichols et al., 1999; Khasabov et al., 2002) y al CGRP (Seybold et al., 2003) en el procesado de información dolorosa a nivel espinal y su posterior transmisión a niveles superiores del SN (Henry, 1994; Mantyh, 2002).

Actualmente, el foco ha sido dirigido también hacia otros dos neuropéptidos: Galanina (Liu y Hökfelt, 2002) y el Neuropéptido Y (Hökfelt et al., 1994b; Ossipov et al., 2002; Silva et al., 2002). Sin embargo, y aún después de más de 20 años de intenso estudio, el debate alrededor del papel exacto que estos neurotransmisores tienen en la generación y/o atenuación del dolor persiste.

### *Diseción de un modelo de dolor crónico*

#### **Sistema NPYérgico**

En la presente tesis, estudiamos la relevancia de considerar el grado de compresión del nervio ciático como un factor influyente sobre los cambios en la expresión de algunos neuropéptidos y sus receptores en neuronas aferentes primarias, así como en el desarrollo de la conducta dolorosa. Los efectos de una lesión parcial del nervio ciático sobre la conducta dolorosa han sido extensamente estudiados en trabajos previos. La compresión (Bennett y Xie, 1988), sección incompleta (Seltzer et al., 1990), isquemia (Gazelius et al., 1996), o la sección diferenciada de algunas de las ramas de división del nervio ciático (Decosterd y Woolf, 2000), afectan dramáticamente la percepción del dolor. Al mismo tiempo, este tipo de lesiones inducen cambios notables en la expresión de diversos neuropéptidos en los GARDs (Noguchi et al., 1993; Nahin et al., 1994; Hökfelt et al., 1994a; Ma y Bisby, 1997; 1998a, b). Incluso, estos cambios pueden ser tan dramáticos como los observados luego de la axotomía del nervio ciático, como fuera observado para NPY luego de ICC (Ma y Bisby, 1998a).

La aplicación de cuatro ligaduras suaves alrededor del nervio nervio ciático (ICC) induce un grado de compresión que va desde 25 a 75% del diámetro del nervio (Bennett y Xie, 1988). Esta variabilidad en la intensidad de la injuria nerviosa podría a su vez inducir cambios aleatorios en el fenotipo de las neuronas aferentes primarias. De hecho, incluso el patrón de degeneración de fibras mielínicas y amielínicas dependería del grado de lesión del nervio ciático (para referencias, ver Mosconi y Kruger, 1996). Por estas razones, ideamos una variación del modelo de Bennett, practicando una sola ligadura del nervio ciático, y estudiamos los efectos sobre la expresión protéica del NPY y el RY1 en los GARDs y la médula espinal lumbares, inducidos por compresiones de diferente grado. Observamos que, efectivamente, el respectivo



aumento o disminución de estos marcadores se relaciona con el grado de compresión del nervio ciático: a mayor grado de compresión, mayor el incremento en la expresión del NPY y la reducción del RY1 y viceversa (Fig., V. 2, 3, 4). Ya habían sido descritos los efectos de lesiones constrictivas sobre la expresión del NPY (Nahin et al., 1994; Ma y Bisby, 1997; 1998a, b), pero este es el primer trabajo en el cual se detalla el efecto que lesiones de diferente grado inducen sobre la expresión del RY1. Observamos una considerable disminución en el número de PNs RY1-IRs luego de lesiones extremas (Axo, CUNP ‘intensa’), siendo persistente en el tiempo. Por su parte, la CUNP ‘media’ también mostró una disminución considerable del RY1, y estuvo acompañada por la alodinia mecánica más intensa en comparación con cualquiera de los otros grupos estudiados, de acuerdo con trabajos previos analizando los efectos de lesiones parciales del nervio ciático sobre la conducta dolorosa (Fig. V.6) (Bennett y Xie, 1988; Kim et al., 1997; Pitcher et al., 1999). Los cambios fenotípicos ocurridos en los GARDs luego de las CUNPs podrían estar relacionados con los mecanismos conducentes al dolor (ver más adelante).

Es sabido que las lesiones de un nervio periférico ocasionan cambios en la excitabilidad de las neuronas aferentes primarias de muy diversas maneras (Millan et al., 1999). Por otro lado, diferentes lesiones de tipo constrictivo afectan significativamente la morfología de fibras mielínicas y amielínicas (Mosconi y Kruger). Esto podría ser importante ya que, como se indicó en la introducción de esta tesis, las fibras A $\alpha$ / $\beta$  serían capaces de transmitir información dolorosa (Lawson, 2002). Resultados no publicados (Musolino P, Brumovsky PR, Villar MJ) muestran que CUNPs intensas inducen cambios dramáticos en la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) presente en fibras mielínicas gruesas y finas, reflejando el efecto deletéreo de la lesión sobre las mismas, aunque es muy probable un efecto paralelo

sobre fibras finas tipo C (Mosconi y Kruger, 1996). Por su parte, las CUNPs ‘medias’ exhibieron cambios moderados pero consistentes en la expresión de MBP, mientras que las CUNPs ‘suaves’ indujeron los menores cambios. El dolor que ratas con neuropatía diabética exhiben, acompañado de un fuerte compromiso de fibras mielínicas (Khan et al., 2002), sugiere la relación de estas últimas con la fisiopatología del dolor neuropático. Incluso, pacientes con neuropatía periférica presentan una alteración más severa de la sensibilidad mecánica que térmica (transportado por fibras gruesas mielínicas) (Bouhassira et al., 1999; Sieweke et al., 1999). Notablemente, Ossipov y cols (2003) han observado que en ratas con mononeuropatía, donde se detecta un aumento en el transporte del NPY producido en neuronas grandes de los GARDs (productoras de fibras mielínicas) hacia el núcleo delgado del bulbo encefálico, la aplicación i.t. de antagonistas del RY1 a este nivel inhibe el dolor neuropático (Ossipov et al., 2002).

Sin embargo, en pacientes humanos, las neuropatías de fibras mielínicas no siempre se asocian con dolor (Nathan, 1976), así como la lesión selectiva de fibras C no es enteramente capaz de inducir dolor (Simone et al., 1998). Todas estas evidencias indican que la afectación de fibras mielínicas y amielínicas, e inclusive de fibras no directamente lesionadas (Campbell, 2001; Koltzenburg y Scadding, 2001) sería necesaria para el desarrollo de dolor neuropático observado luego de lesiones constrictivas de un nervio periférico. De hecho, la degeneración selectiva de fibras mielínicas producidas por motoneuronas espinales induce la actividad espontánea de fibras C-aférentes no lesionadas y la generación de dolor neuropático (Wu et al., 2002). Más estudios son necesarios para comprender la relación existente entre el grado de compresión de un nervio y la inducción de dolor, y la alteración en la proporción de fibras mielínicas vs. amielínicas / sanas vs. lesionadas.

**Efectos de lesiones intensas del nervio ciático sobre la expresión del RY1 a nivel espinal**

Lesiones dramáticas del nervio ciático (axotomía y CUNP ‘intensa’), pusieron en evidencia la disminución de la expresión del RY1 en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal lumbar (Fig. V.5). Este cambio podría estar reflejando varios eventos:

1. Un evento funcional, con internalización de unidades del RY1. Este efecto ya ha sido extensamente descrito para el receptor de SP, NK-1 (Mantyh et al., 1995; Allen et al., 1999; Honoré et al., 1999). Sin embargo, lejos de desaparecer, la inmunoreactividad del NK-1 cambia el patrón de distribución celular desde la membrana plasmática hacia el citoplasma y de ahí a la membrana nuevamente, como se observó luego de la inflamación periférica (Mantyh et al., 1995; Honoré et al., 1999). La activación prolongada de receptores acoplados a proteína G disminuye la sensibilidad del receptor al agonista (Bohm et al., 1997). Por otro lado, la aplicación de NPY induce la rápida internalización y desensitización de RY1s expresados en células HEK293, con recuperación a los 30 minutos de aplicado el agonista. Es interesante que la lenta recuperación de la expresión en membrana del RY1 y su actividad no se asocie a síntesis *de novo* del receptor, sino más bien al reciclado de las moléculas internalizadas (Gicquiaux et al., 2002). Por el contrario, el RY2 no sufre internalización (Gicquiaux et al., 2002). Si la disminución de la expresión del RY1 luego de la axotomía refleja internalización, es un hecho que requiere más investigación.

2. La disminución del RY1 podría reflejar una dramática muerte neuronal, ya demostrado usando diferentes técnicas en el asta dorsal luego de axotomía

(Sugimoto et al., 1990; Azkue et al., 1998) o ICC (Sugimoto et al., 1990; Hama et al., 1996; Kawamura et al., 1997; Mao et al., 1997; Whiteside y Munglani, 2001; Moore et al., 2002);

3. Finalmente, podría tratarse de un mecanismo de protección celular de neuronas lesionadas. Se ha mostrado que la eliminación del RY1 en ratones C57Bl/6 protege a las neuronas aferentes primarias de la muerte neuronal ocasionada por la axotomía del nervio ciático de una semana de evolución en comparación con la intensa pérdida neuronal observada en ratones Wt (Shi et al., 2001). Así, en ratas con lesión de un nervio periférico, la disminución del RY1 en la membrana de las neuronas sensoriales podría tener como fin evitar la excesiva activación del mismo por el aumento en la secreción de NPY desde aferencias primarias, protegiéndolas de la muerte neuronal. Esto, a su vez, podría afectar secundariamente la transmisión del dolor (ver más adelante).

### **NPY y Dolor**

El rol del NPY en el procesamiento del dolor es ambiguo. Se le adjudican funciones pronociceptivas (Tracey et al., 1995; White, 1997), analgésicas (Xu et al., 1999; Naveilhan et al., 2001) o bifásicas (Xu et al., 1999). De hecho, algo similar ocurre a nivel del SNC, donde el NPY tiene acción pro- y anticonvulsiva (ver Paredes et al., 2003 y sus referencias).

Complicando más aún el escenario, la acción del NPY podría ser simultáneamente relevante a nivel periférico (Tracey et al., 1995; Naveilhan et al., 2001), espinal (White, 1997; Xu et al., 1999; Naveilhan et al., 2001), ó supraespinal (Zhang et al., 2000; Ossipov et al., 2002).

En la periferia, el NPY afecta la secreción de noradrenalina (NA) desde terminales simpáticas (Tracey et al., 1995). Esta acción podría influenciar secundariamente la sensibilidad y excitabilidad de terminales sensoriales en la piel, las que probablemente expresan receptores noradrenérgicos (Shi et al., 2000), induciendo dolor (Tracey et al., 1995). Sin embargo, la presencia del RY1 en terminales nerviosas de neuronas aferentes primarias (Brumovsky et al., 2002), y la disminución de la secreción de SP desde las mismas colaborando con el déficit en la inflamación neurogénica observado en ratones RY1-KO (Naveilhan et al., 2001), revelan un papel del RY1 en procesos de neurotransmisión periférica por activación por NPY.

A nivel de los GARDs, los cambios en la expresión del NPY y sus receptores luego de la lesión del nervio ciático podrían tener consecuencias directas en el seno ganglionar, induciendo alteraciones en la excitabilidad neuronal (Mantyh et al., 1994; Amir y Devor, 1996). Al respecto, se ha demostrado la secreción intraganglionar de CGRP en el ganglio trigémino (Ulrich-Lai et al., 2001) y SP en los GARDs (Huang y Neher, 1996). De un mecanismo tal podrían participar el NPY y el RY2, ambos aumentados en neuronas medianas/grandes y pequeñas, respectivamente, luego de la injuria nerviosa. De hecho, el efecto normalmente excitatorio que la activación del RY2 exhibe sobre neuronas de los GARDs se incrementa luego de la axotomía del ciático (Abdulla y Smith, 1999a, b). Por el contrario, la activación del RY1 no induce cambios en la excitabilidad de neuronas aferentes primarias, aunque su acción natural sobre canales de  $\text{Na}^{2+}$  se vea afectada por la lesión del nervio (Abdulla y Smith, 1999a, b), probablemente debido a la disminución de su expresión en neuronas de los GARDs (Zhang et al., 1994a; 1995a, d).

A nivel espinal, observamos que la expresión del RY1 disminuye en el lado ipsilateral a la lesión severa del nervio ciático en neuronas de la lámina II del asta

dorsal. Este efecto podría tener lugar en tres tipos de neurona: *interneuronas inhibitorias*, *excitatorias*, o *neuronas de proyección*. La disminución del RY1 en interneuronas inhibitorias podría significar un mecanismo de protección del tono inhibitorio sobre otras interneuronas excitatorias o neuronas de proyección. Esto, sumado a la acción inhibitoria del NPY sobre la secreción de SP (Duggan et al., 1991) y posiblemente otros NTs excitatorios desde aferencias primarias, a través de los RY2s (Duggan et al., 1991), probablemente por su capacidad de inhibir canales de  $Ca^{2+}$  (Toth et al., 1993; Rhim et al., 1997), podrían colaborar en los intentos del sistema espinal de incrementar el potencial antinociceptivo.

Sin embargo, la disminución del RY1 podría ocurrir en interneuronas *excitatorias*, lo que resultaría en el aumento del tono excitatorio espinal, por medio de proyecciones desde las láminas I-II hacia láminas profundas del asta dorsal (III-V) (Duggan et al., 1977; Eckert III et al., 2003). Muchas de las neuronas RY1-IR de las láminas I-II colocalizan somatostatina (SOM) (Zhang et al., 1999). Asimismo, un trabajo muy reciente muestra que el 97.5% de los botones axonales de neuronas locales SOM-IR en las lámina I-II coexpresan el transportador vesicular de glutamato-2 (VGLUT-2), sugiriendo que la mayoría de estas neuronas tendría glutamato como principal neurotransmisor (Todd et al., 2003). La disminución del RY1 en interneuronas SOM/VGLUT-2-IR podría tener consecuencias directas en la excitabilidad del asta dorsal luego de la lesión nerviosa periférica.

En esta tesis, describimos la presencia del RY1 en numerosas neuronas profundas del asta dorsal (III-V) (Figs. X.2, 4). Es posible que varias de ellas sean interneuronas, y más estudios son necesarios para definir sus características. Sin embargo, la presencia del receptor en láminas profundas podría corresponder a neuronas de proyección. De hecho, inclusive algunas de las neuronas intensamente RY1-IRs en

las láminas I-II correspondan a la misma subpoblación. Neuronas de proyección RNK1-positivas presentes en las láminas III-IV reciben contactos sinápticos de fibras NPY-IR de origen probablemente local (Polgár et al., 1999). Así, el receptor no tendría sólo una localización presináptica (interneuronas y aferencias primarias), sino también postsináptica (neuronas de proyección) e inclusive ambas sugierendo el rol potencialmente inhibitorio del NPY actuando sobre el RY1. Si este fuera el caso, el mismo podría reducir el input excitatorio de estas neuronas hacia niveles supraespinales. Incluso, si esta población neuronal sufriera también la disminución en la expresión del RY1 observada en la lámina II luego de la lesión nerviosa periférica, se podría producir una atenuación de la capacidad inhibitoria del NPY en estados de dolor crónico. Son necesarios más estudios que permitan definir el fenotipo de estas neuronas RY1-IR profundas, así como el patrón y origen de sus contactos sinápticos y los cambios producidos por lesiones de nervios periféricos.

Varios estudios certifican el rol inhibitorio del NPY actuando sobre el RY1. Así, la hipersensibilidad térmica inducida por la inflamación cutánea fue contrarrestada por la aplicación i.t. de NPY o agonistas del RY1 (Taiwo y Taylor, 2002). Esto se correlaciona con el aumento en la expresión del RY1 en los GARDs y a nivel espinal luego de inflamación de la piel en ratas (Ji et al., 1994). Esto contrasta con las observaciones de White (1997) quien, usando el modelo de Bennett, observó que la inyección i.t. prolongada de NPY o agonistas del RY1 inducen aún mayor alodinia en ratas con dolor neuropático. No existe hasta el momento una explicación satisfactoria para esta divergencia en la actividad del NPY sobre los mecanismos del dolor crónico. Sin embargo, se ha descripto que el NPY es capaz de activar proteínas G en la corteza cerebral de ratas de dos maneras diferentes: el modo convencional mediado por receptor a través del RY1 cuando su concentración es baja, y de un modo directo activando

proteínas G sin la participación de un receptor (receptor-independiente) cuando el NPY se encuentra a altas concentraciones (Odagaki et al., 1999). Por otro lado, se observó que dosis bajas únicas de NPY en ratas no lesionadas o luego de axotomía del nervio ciático inducen dolor, mientras que dosis altas lo reducen (Xu et al., 1999). Esto se contradice con las observaciones de White, pero podría ser posible que se debiera a la condición experimental particular. Así, la aplicación crónica de NPY o sus agonistas podría activar mecanismos receptor-independiente, un fenómeno quizás inexistente durante la inyección única del péptido. Hasta el momento, sólo se ha demostrado la activación receptor-independiente de proteínas Gi/o por NPY, aunque podría deberse al tipo de receptor activado (Xu et al., 1999). Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que el mismo activara proteínas G excitatorias, u otras vías intracelulares que condujeran al aumento de la excitabilidad neuronal del asta dorsal.

### *Sistema Galaninérgico*

#### **Roles de Gal como neuropéptido excitatorio e inhibitorio del dolor**

Por varios años se sugirió el rol inhibitorio de Gal a dosis altas sobre la transmisión nerviosa en animales no lesionados (Yanagisawa et al., 1986; Cridland y Henry, 1988; Post et al., 1988; Wiesenfeld-Hallin et al., 1988). Sin embargo, la facilitación a dosis bajas del reflejo flexor en ratas anestesiadas (Wiesenfeld-Hallin et al., 1988, 1989a, b; Kuraishi et al., 1991), sumado a los inesperados resultados de Kerr y cols., quienes observaron una reducción en la conducta dolorosa en ratones Gal-KO (Kerr et al., 2000), generaron gran confusión alrededor del rol concreto que la Gal tendría en el procesado del dolor.

El descubrimiento de diferentes subtipos de receptor galaninérgico y la generación de agonistas específicos nos permitió dilucidar algunos de los mecanismos



que explicarían la participación de Gal en procesos de transmisión de información dolorosa (ver capítulo VI). De este modo, usando un agonista selectivo para RGal2 (AR-M1896) y otro no selectivo para RGal1 y -2 (AR-M961) (Tabla VI.1) observamos que, en condiciones normales, ambos agonistas inducen dolor (Fig. VI.1). Sin embargo, la lesión de un nervio periférico expone el rol antinociceptivo de Gal, actuando específicamente sobre RGal1s. A esta conclusión llegamos al observar que en ratas afectadas con dolor neuropático, la aplicación de AR-M961 indujo analgesia, mientras que AR-M1896 no tuvo efecto alguno (Fig. VI.2). Estos eventos probablemente se correlacionan con los cambios detectados en la expresión de Gal y sus receptores luego de axotomía (y presumiblemente lesiones constrictivas). Así, la axotomía del ciático induce una disminución en la expresión de los RGal1 y -2 en los GARDs (Xu et al., 1996b; Shi et al., 1997; Zhang et al., 1998b), presumiblemente reduciendo su transporte (de ambos o alguno de ellos) hacia la médula espinal por vía de las raíces dorsales y causando una disminución de los sitios de unión de Gal en aferencias primarias (Kar y Quirion, 1992). Llamativamente, no se observó alteración en la expresión del RGal1 en neuronas locales del asta dorsal (Zhang et al., 1998b). Todo esto sugiere que, luego de la lesión, se potenciaría la acción antinociceptiva de Gal a nivel espinal, a través de la activación de RGal1 y cascadas intracelulares conducentes a la depresión de la actividad neuronal. Por el contrario, la activación del RGal2 en condiciones normales o luego de inflamación de la piel, donde su expresión es marcadamente aumentada en los GARDs (Xu et al., 1996b; Zhang et al., 1998b), así como lo es para Gal en los GARDs e interneuronas del asta dorsal (Ji et al., 1995), favorecería el efecto proalgésico del péptido. En este sentido, la probable activación del RGal2 como autoreceptor en aferencias primarias potenciaría la secreción de neurotransmisores (NTs) excitatorios,

no descartándose la potencial activación del receptor en los cuerpos neuronales de los GARDs afectados (Liu y Hökfelt, 2002).

Numerosos estudios electrofisiológicos confirman nuestros resultados. Así, Flatters y cols. han demostrado que la aplicación de diferentes dosis i.t. de Gal producen un efecto ya sea excitatorio o inhibitorio, dependiendo de la condición del animal tratado (normal = dolor vs. neuropático = antinocicepción) (Flatters et al., 2002; 2003). Asimismo, la actividad de neuronas WDR en las láminas profundas del asta dorsal lumbar se vió significativamente inhibida luego de la aplicación de Gal i.t. en ratas con dolor neuropático (Xu et al., 2000a). También, en ratones RGal1-KO se demostró un aumento moderado en la sensibilidad al calor y el frío, potenciada luego de la lesión parcial del nervio ciático, en comparación con lo observado en ratones Wt (Hygge-Blakeman et al., 2003a). Finalmente, la aplicación i.t. de oligonucleótidos antisentido para el RGal1 redujeron la acción inhibitoria de Gal sobre la excitabilidad del reflejo flexor (Pooga et al., 1998; Rezaei et al., 2001). Todas estas evidencias puntualizan el rol de Gal como agente antinociceptivo, actuando sobre RGal1 presentes en interneuronas locales del asta dorsal con su consecuente inhibición (Liu et al., 2001; Liu y Hökfelt, 2002). Más estudios son necesarios para demostrar si el RGal1 también se halla presente en neuronas de proyección.

### **La sobreexpresión de Gal en neuronas aferentes primarias posee efecto analgésico**

En la presente tesis, hemos mostrado el perfil inmunohistoquímico que exhiben ratones GalSE (DBH) (Steiner et al., 2001) en diferentes tejidos nerviosos periféricos (GARDs; GSS; terminales nerviosas en piel) y centrales (médula espinal). En estos ratones, una copia extra del gen de Gal fue asociada al promotor de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, de modo tal que toda neurona noradrenérgica

expresara/sobreexpresara Gal (Crawley et al., 2002). Sin embargo, y para nuestra sorpresa, los ratones transgénicos mostraron una aumentada expresión de Gal en PNs pequeños y otros grandes y medianos en los GARDs L5 respecto de ratones Wt (Figs. IX.3, 7, 9). Un porcentaje elevado de neuronas pequeñas Gal-IRs de los GARDs de ratones GalSE y Wt colocalizaron con CGRP, mientras que un bajo porcentaje de las neuronas medianas y grandes presentes en los ratones GalSe colocalizaron ambos péptidos (Figs., IX.4, 5, 6). La axotomía del nervio ciático indujo un incremento muy marcado en el número de PNs Gal-IR de diferentes tamaños en ambos ratones (Figs. IX.9, 10). La magnitud del aumento en neuronas pequeñas no mostró diferencias significativas entre los ratones Wt y GalSE, siendo para ambos muy importante en comparación con el lado contralateral (Fig. IX.10). Por el contrario, el aumento moderado en la subpoblación de neuronas grandes, fue más notorio en los ratones Wt, donde en condiciones normales no se observan neuronas Gal-IR con este tamaño (como se indicó más arriba, los ratones GalSE ya sobreexpresan Gal en alrededor del 5 % de los PNs totales del GARD, principalmente medianos y grandes) (Fig. IX.10).

La expresión de Gal en las láminas más superficiales del asta dorsal de la médula espinal en los ratones GalSE y Wt fue similar (Fig. IX.11), y observamos una mayor cantidad de perfiles fibrosos Gal-IR en las astas ventrales de los ratones transgénicos, de posible origen supraespinal (Fig. IX.12). Sin embargo, experimentos de colocalización de Gal con 5-HT, usado como marcador de una subpoblación de fibras descendentes supraespinales (Dahlstrom y Fuxe, 1965) mostraron un muy bajo grado de colocalización (Fig. IX.12).

Los ratones Gal-SE exhibieron numerosas fibras Gal-IR en las glándulas sudoríparas ubicadas en la piel de la planta de la pata posterior, prácticamente ausentes en los ratones Wt (Fig. IX.8). Finalmente, en comparación con los ratones Wt, la

expresión de Gal en los GSS de los ratones GalSE fue varias veces mayor, tanto en cantidad de perfiles Gal-IR como en la intensidad de inmunoreacción (Fig. IX.6).

Todos los resultados de inmunohistoquímica detallados más arriba fueron confirmados por estudios de hibridación *in situ* (Fig. IX.7).

La expresión de Gal en neuronas de los GARDs es sorprendente y plantea interrogantes, ya que supuestamente estas neuronas no expresan noradrenalina. Tan sólo una subpoblación de neuronas mayoritariamente pequeñas expresa normalmente en el ratón otra enzima, la tirosina hidroxilasa (TH) (Fig. IX.5, 6). Sin embargo, nosotros sólo detectamos algunas pocas neuronas Gal/TH-IRs en los ratones transgénicos (Figs. IX.5, 6). Una explicación podría ser que la manipulación genética de estos ratones, sumado a la posibilidad de cross-linking con otro promotor durante la combinación de las células troncales (stem cells) utilizadas para transfectar Gal en ratones hembra, indujera la expresión ectópica del péptido.

Desde el punto de vista conductual, los ratones GalSE (DBH) presentan un estado de protección al dolor, el cual se acentúa luego de la lesión parcial del nervio ciático (Hygge-Blakeman et al., 2003b) (Figs. IX.1, 2). Así como para nuestros ratones, el rol inhibitorio de Gal fue observado en otras dos líneas de ratones GalSE a saber:

-ratones GalSE bajo el control del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGFb) y que sobreexpresan Gal en forma ectópica en numerosos sitios del sistema nervioso (Hygge-Blakeman et al., 2001),

-ratones GalSE que sobreexpresan constitutivamente niveles más altos de Gal en los GARDs y la médula espinal bajo el control de las secuencias reguladoras de 12-kb que flanquean el gen de c-Ret roedor (Holmes et al., 2003). En los GARDs en particular, estas secuencias reguladoras de 12-kb se expresarían mayoritariamente en neuronas isolecitina B (IB4)-positivas (Sukumaran et al., 2001).

En común con nuestros resultados, la expresión de Gal en estos dos tipos de ratón fue observada en neuronas pequeñas y llamativamente en neuronas grandes (Holmes et al., 2003; Hygge-Blakeman et al., 2001). Holmes y cols. (2003) observaron que aquellas neuronas que expresaron más intensamente Gal son IB4 negativas, de acuerdo con reportes previos que muestran que un 21% de las neuronas c-Ret positivas de los GARDs no expresan IB4 y son en su mayoría grandes (Bennett et al., 1998). Nosotros observamos que las neuronas grandes y medianas de nuestros ratones son en su mayoría CGRP-negativas, aunque son necesarios estudios que definan si estas neuronas son IB4-negativas. Sin embargo, Bergman y colaboradores (1999) observaron que ratas adultas jóvenes poseen una subpoblación de neuronas IB4-/CGRP-negativas (Bergman et al., 1999).

Clarificar el fenotipo y características de estas neuronas podría ser importante, ya que se ha demostrado que neuronas IB4-negativas proyectan principalmente hacia la lámina I y la parte externa de la lámina II, dónde se encuentra un gran número de neuronas nociceptivas (Bennett et al., 1998). Estas neuronas podrían potencialmente expresar el RGal1 y ser inhibidas por los elevados niveles de Gal en los ratones GalSE (Liu et al., 2001; Liu y Hökfelt, 2002) probablemente secretado desde fibras provenientes de neuronas Gal+/IB4-/CGRP-. Sin embargo, también es posible que las neuronas grandes observadas en los ratones GalSE (DBH) proyectaran hacia láminas profundas de la médula espinal, actuando sobre neuronas de proyección potencialmente RGal1-positivas, e inhibiendo su actividad.

Es también muy posible que estos ratones sufran cambios en la expresión de receptores para Gal, lo que podría alterar la percepción dolorosa en estos animales, aunque este aspecto queda sujeto a futuro análisis.

## **El RY1 del NPY es transportado por axones de neuronas sensoriales**

Durante varios años se consideró al RY1 como un receptor de exclusiva localización somática, mientras que el RY2 sería transportado hacia los procesos axonales de neuronas aferentes primarias (Wahlestedt et al., 1986). Sin embargo, reportes más recientes sugieren la acción presináptica del RY1 en diversos sistemas neuronales del SN (Peaire et al., 1997; Pickel et al., 1998; St-Pierre et al., 2000; Paredes et al., 2003). Fue en este contexto que, gracias a un anticuerpo de gran afinidad por el RY1 y la ayuda de un kit de inmunohistoquímica muy sensible (TSA plus) (Adams, 1992), pudimos finalmente constatar la presencia del RY1 en los procesos axonales de las neuronas aferentes primarias de la rata adulta (Fig. VII.1), sumándose a la observación del RY1 en procesos axonales trigeminales en la rata embrionaria y recién nacida (Ubink et al., 2001). De hecho, pudimos demostrar la presencia del receptor tanto en terminales nerviosas periféricas a nivel de la piel, como en terminales aferentes al asta dorsal (Figs. VII.1; X. 3). Confirmando el transporte del RY1, el crush del nervio ciático indujo la acumulación del receptor en el lado proximal a la lesión (Fig. VII.2). Si la acumulación del receptor corresponde exclusivamente a fibras sensoriales somáticas, o también existe la participación de fibras sensoriales viscerales provenientes del plexo parasimpático pélvico, como lo sugeriría la presencia del mismo en el ganglio nodoso (Corp y Smith, 1991; Ghilardi et al., 1994) no ha sido estudiado. Sin embargo, la colocalización del RY1 y CGRP en las proyecciones periféricas del nervio ciático, inclusive en la epidermis de la pata posterior de la rata, certifican su presencia en fibras sensoriales somáticas provenientes de los GARDs (Figs. VII.3, 4).

La expresión del RY1 en el nervio ciático fue en apariencia mayor en comparación con la observada en las raíces dorsales (Fig. VII.1). Trabajos previos sugieren que existe un transporte diferencial de algunos péptidos en neuronas aferentes

primarias, con un mayor transporte hacia las terminales periféricas, tal como fuera observado para SP en el conejillo de indias (Brimijoin et al., 1980). También observamos un mayor número de fibras Gal-IR en las prolongaciones periféricas de los GARDs de ratones Wt y GalSE (DBH) (resultados no mostrados). Esto podría ser consecuencia de un mecanismo de distribución intraneuronal. Así, se han descripto más de 30 clases de proteínas transportadoras que pertenecen a la superfamilia de las kinesinas (KIF) (Miki et al., 2001). Aparentemente, cada molécula producida por una neurona estaría estrechamente relacionada con un transportador específico, el cual regularía por ejemplo la rapidez y el volúmen con el que tal molécula alcanzaría su destino (Miki et al., 2001). Sin embargo, aún no existen pruebas de subpoblaciones de KIFs con destino axonal o dendrítico exclusivo, y mucho menos periférico y central como podría ser el caso de las neuronas pseudomonopolares de los GARDs. Aun así, la expresión del RY1, tanto en piel como en el asta dorsal fue notablemente menor a la observada en el nervio ciático ó la misma raíz dorsal. La baja expresión observada en el asta dorsal quizás se deba al menor transporte del receptor proveniente de los GARDs. Sin embargo, la abundante expresión del RY1 en neuronas locales del asta dorsal en las láminas I-II podría ocultar la discreta expresión del receptor en fibras finas tipo C que alcanzarían dichas láminas. En la capa epidérmica de la piel, es posible que el transporte sea continuo pero bajo, y se halle en niveles por debajo de los detectables por inmunohistoquímica, a excepción de las pocas fibras aisladas observadas durante el desarrollo de esta tesis.

Desde un punto de vista funcional, el conocimiento acerca del origen del NPY actuando sobre las proyecciones periféricas RY1-IRs de los GARDs es parcial. El NPY contenido en fibras simpáticas (Lundberg y Tatemoto, 1982; Lundberg et al., 1982; Lundberg et al., 1983; Ekblad et al., 1984) y formando plexos perivasculares profusos

en la piel de la rata (Weihe et al., 1994) podría activar RY1s en forma tónica. Se ha demostrado que el RY1 es un elemento necesario para la generación de inflamación neurogénica (Naveilhan et al., 2001; Dimitrijevic et al., 2002). De hecho, se ha sugerido un aumento en la secreción del NPY durante el desarrollo de procesos inflamatorios en la piel de la rata (Weihe et al., 1994), el cual podría actuar sobre vasos sanguíneos (ver más adelante y Capítulo VI) y fibras sensoriales RY1-positivas. El NPY tiene la capacidad de inhibir la respuesta motora visceral y la secreción de neurotransmisores de neuronas sensoriales somáticas que inervan tejidos periféricos (ver Ghilardi et al., 1994 y sus referencias). Esta acción se relacionaría con los RY2s (Duggan et al., 1991). Sin embargo, la acción facilitatoria del NPY sobre la inflamación neurogénica actuando sobre RY1s, en ratones RY1-KO (Naveilhan et al., 2001) sugiere una suerte de balance en la acción del NPY, dependiendo del tipo de receptor activado, la magnitud de activación de los mismos o los cambios ocasionados por una lesión nerviosa periférica o la inflamación.

La actividad de los RY1s en terminales centrales es desconocida. Su activación podría disminuir la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Chen et al., 1996; McQuiston et al., 1996; Silinsky, 1985; Scholz y Miller, 1992; Sun et al., 1998), modulando a su vez la secreción de NTs excitatorios producidos en los GARDs, con la subsiguiente reducción del dolor. De hecho, la activación del RY1 en aferencias primarias reduce la secreción de SP (Duggan et al., 1991). Sin embargo, se ha descrito que el NPY, actuando sobre el RY1 en los GARDs potencia la corriente de canales L de  $Ca^{2+}$  (Abdulla y Smith, 1999a, b). Por otro lado, el NPY inhibiría el transporte axonal de partículas, actuando sobre RY1 e -Y2 (Hiruma et al., 2002). En tal caso, la disminución del RY1 en neuronas pequeñas de los GARDs que expresan a su vez SP podría



contribuir con el aumento de la secreción del péptido a nivel de las terminales centrales y quizás periféricas de las neuronas aferentes primarias.

### **Localización periférica del RY1 – Presencia en parénquima no neural**

El RY1 estuvo presente en el sistema vascular de la mayoría de los tejidos de roedores, localizado principalmente en vasos de pequeño y mediano calibre (hasta 200  $\mu\text{m}$ ). Además, observamos que el RY1 se expresa en células de la mucosa del estómago así como en neuronas del plexo mientérico; un considerable número de células de los islotes de Langerhans del páncreas (varias colocalizando SOM); una buena parte de las células cromafines de la médula adrenal; células musculares estriadas del pabellón auricular de la rata; en los túbulos colectores de la papila renal y algunas células de la vesícula seminal en el tracto genital masculino. Notablemente, hallamos expresión del RY1 en vasos sanguíneos muy pequeños en la glándula tiroidea, probablemente capilares (Figs. VIII.1-8).

Las acciones del NPY en diferentes órganos han sido descriptos en numerosos estudios. Sin embargo, no todos nuestros resultados morfológicos reflejaron fielmente los datos obtenidos en estudios farmacológico/funcionales. Por otro lado, detectamos el RY1 en órganos en los cuales nunca antes se describiera su presencia, y sorprendentemente en células parenquimatosas. Tuvimos especial cuidado en corroborar la especificidad de nuestro anticuerpo practicando diferentes tests. Así, prebloqueamos nuestro anticuerpo usando el péptido inmunogénico del RY1 y lo aplicamos sobre todo el tejido analizado tanto de la rata como del ratón. El patrón de tinción del RY1 fue completamente eliminado usando el anticuerpo prebloqueado, con la excepción de las células de la sangre. Afortunadamente, nuestro anticuerpo generado contra el segmento C-terminal del RY1 reacciona en forma cruzada con el receptor del ratón, aunque la

intensidad de la tinción fue un poco menos marcada en el ratón. Esto podría deberse a la diferencia estructural del RY1, donde la secuencia C-terminal del mismo no es exactamente igual en uno y otro animal. Por otro lado, no se puede descartar la existencia de una versión truncada del RY1, como fuera observado en el ratón (Nakamura et al., 1995). Otro test de especificidad consistió en el análisis de la expresión del RY1 en ratones KO para el mismo (Pedrazzini et al., 1998), y comparándolo con lo observado en ratones Wt. Observamos que los patrones de tinción desaparecieron completamente en el ratón transgénico (excepto en células sanguíneas). Finalmente, estudios previos demuestran que los patrones de inmunofluorescencia del RY1 se correlacionan con la expresión del mensajero del RY1 en el cerebro de rata y ratón (Kopp et al., 2002).

Hallamos expresión del RY1 en la mayoría de los lechos vasculares estudiados, en vasos arteriales de un calibre no superior a 200  $\mu\text{m}$ . El RY1 no posee un rol crucial en el mantenimiento de la presión sanguínea homeostática, pero podría modular el tono simpático en varios lechos vasculares (Pedrazzini et al., 1998), facilitando el efecto vasoconstrictor de la noradrenalina (Wahlestedt et al., 1985). Tal evento podría deberse a un aumento en la cantidad de unidades de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en la membrana plasmática de células del tejido vascular sanguíneo, por reclutamiento inducido por NPY (Holtbäck et al., 1999). Sin embargo, también se ha descrito la actividad vasodilatadora del NPY, actuando sobre el endotelio cerebral (You et al., 2001). Es posible que la abundante expresión del RY1 en vasos de variado calibre (no mayor de 200 $\mu\text{m}$ ) en varios de los órganos estudiados colabore en la regulación fina del flujo sanguíneo y por consiguiente de la actividad de los mismos.

En la glándula tiroides, además de vasos arteriales pequeños, detectamos inmunoreactividad para el RY1 en numerosos vasos pequeños carecientes de la actina- $\alpha$

de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). La expresión de  $\alpha$ -SMA se limita a pericitos localizados en los lechos pre- y postcapilar, pero no en capilares medios (Niehls y Drenckhahn, 1991). Esto sugiere que la expresión del RY1 observada en nuestro estudio correspondería a capilares sanguíneos, algo no demostrado hasta el momento. Sin embargo, estos vasos podrían contener una clase distinta de actina del músculo liso, tal como ocurre con distintas isoformas de miosina en arterias cerebrales de diferente calibre y capilares (Hoya et al., 2003). Sería interesante demostrar que estos supuestos capilares poseen RY1 en los pericitos que rodean al vaso. El RY1 podría tener algún efecto vasomotor actuando sobre estas células, aunque la presencia de una maquinaria contráctil en pericitos no garantiza su funcionalidad (Bandopadhyay et al., 2001). De hecho, la acción sobre los pericitos o células endoteliales podría no relacionarse con actividades contráctiles, sino con mecanismos de permeabilidad. Así, en el endotelio microvascular de la rata se pudo mostrar que el NPY reduce la permeabilidad a macromoléculas, así como el contenido de AMPc intracelular, por medio de una proteína Gi/o (Noll et al., 1996). Así, la activación del RY1 en el endotelio arterial y capilar de la glándula tiroidea podría regular la secreción de tiroxina en situaciones de gran gasto metabólico tales como el estrés en donde se detecta a su vez un aumento importante del NPY circulante (Pernow et al., 1986; Castagne et al., 1987; Morris et al., 1987; Zukowska-Grojec et al., 1996).

La presencia del RY1 en la papila renal en células de los túbulos colectores, sugiere su participación en procesos de filtración glomerular y natriuresis por activación por NPY (Echtenkamp y Dandridge, 1989; Persson et al., 1991). El NPY regula la actividad de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa renal junto a la NA, probablemente a través de RY2s (Ohtomo et al., 1994). Asimismo, estudios recientes muestran que el NPY podría ejercer un doble efecto estimulador de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  por inhibición de la

acción bloqueadora de los receptores- $\beta$ -adrenérgicos sobre la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa por una lado, y la estimulación de la acción positiva que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos tienen sobre esta bomba por el otro (Holtbæk et al., 1998). Este doble efecto podría relacionarse con la activación de dos tipos distintos de receptor, pudiendo tratarse de los RY1 e -Y2.

Finalmente, se detectaron varias células cromafines RY1-IR, colocalizando NPY o la feniletanolamina N-metil transfersasa (PNMT) o tan sólo inmunoreactivas para el receptor. La coexpresión del receptor con NPY sugiere su rol como autoreceptor, controlando la secreción intraglandular del péptido. Asimismo, la expresión de PNMT en células RY1-IR indican que el NPY podría afectar la secreción de adrenalina por células cromafines. De existir además células NPY/PNMT/RY1-IR, la secreción de adrenalina podría estar directamente influenciada por la acción de NPY secretado desde la misma célula y actuando sobre autoreceptores RY1. De hecho, la expresión del ARNm del RY1 y catecolaminas en la médula adrenal aumenta en situaciones de ejercicio prolongado bajo condiciones de estrés (Hiremagalur et al., 1994; Levenson y Moore, 1998) ó luego de ejercicio de baja intensidad (Erdem et al., 2002), lo que quizás refleje el incremento en el tono NPYérgico modulador de la actividad de las catecolaminas. Asimismo, la activación del RY1 en la médula adrenal de la rata incrementa la síntesis de catecolaminas (Nussdorfer y Gottardo; 1998), así como la expresión del mensajero de la TH (Hong et al., 1995).

## Conclusiones

El entendimiento del rol que juegan los neuropéptidos en procesos neurales se ha ido clarificando durante los últimos 50 años, incluyendo su relación con varios NTs principales en los diferentes sistemas neuronales del SNC y SNP (léase glutamato, aspartato, acetilcolina, Gaba o glicina, así como las catecolaminas y la serotonina). Sin embargo, la abundante expresión de varios neuropéptidos en la mayoría de las neuronas, la creciente variedad de receptores a los que se unen, y su colocalización con cualquiera de los NTs principales antes mencionados, sugieren un papel auxiliar en la funcionalidad del SN. De hecho, es probable que la regulación fina que los neuropéptidos ejercen sobre la actividad de los NTs clásicos sea condición importante para la correcta transmisión de señales eléctricas entre neuronas y en otros tejidos, diferentes del nervioso.

Muchos grupos de investigación han explorado la variedad de roles para diferentes neuropéptidos, incluyendo procesos tales como la memoria, el sistema cardiocirculatorio, así como el dolor y enfermedades mentales. En esta tesis, nos hemos referido a la participación que ciertos neuropéptidos y sus receptores tienen en los mecanismos del dolor. Al respecto, es posible que el sitio principal de acción de los neuropéptidos se encuentre a nivel del asta dorsal de la médula espinal, donde gran parte de la información dolorosa es retransmitida hacia niveles superiores de procesamiento. Este es un sitio ideal para la modulación de la actividad de fibras aferentes y neuronas de proyección encargadas de la transmisión de información dolorosa hacia niveles superiores del neuroeje. Sin embargo, la abundante expresión de neuropéptidos y receptores en neuronas de los GARDs sugiere la posibilidad de su rol a nivel periférico o inclusive intraganglionar.

Analizamos varios aspectos de los sistemas galaninérgico y NPYérgico usando ratones transgénicos y algunas drogas selectivas para los diferentes subtipos de receptor para neuropéptidos. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas, como por ejemplo cómo un receptor se acopla a diferentes vías intracelulares y/o canales iónicos y las consecuencias que tales relaciones podrían tener según el tejido o neurona considerados. Notablemente, dependiendo del sitio de expresión o la cascada intracelular a la que un mismo receptor se acople, las consecuencias podrían ser estimulatorias o inhibitorias (Van Liefde et al., 1998; Li et al., 2002).

Llamativamente, Gal y NPY, los dos neuropéptidos analizados en esta tesis, se expresan en tipos neuronales mayoritariamente distintos de los GARDs (Gal en neuronas pequeñas; NPY en neuronas grandes). Ambos son dramáticamente afectados en condiciones de injuria periférica, con un aumento notable en sus niveles de expresión, y presentando roles excitatorios e inhibitorios de la actividad neuronal en los GARDs y el asta dorsal. El interjuego que se produciría luego de la lesión de un nervio periférico, con el incremento o la depresión funcional de distintos subtipos de receptores, podría ser relevante en el desarrollo, mantenimiento o inhibición del dolor.

El entendimiento más completo del rol de los neuropéptidos en los procesos de dolor crónico, y la relación de los mismos con muchos otros cambios geno- y fenotípicos ocurridos en el seno de los GARDs y la médula espinal permitirán el desarrollo de nuevas terapéuticas del dolor. En este sentido, la activación y/o inhibición concertada de receptores para distintas moléculas neurotransmisoras, incluyendo Gal y NPY, podría ser una alternativa para el tratamiento del dolor crónico y debilitante.

# Chapter IV

## Results and Discussion

## Neuropeptides and Chronic Pain

An increasing number of publications confirm the participation of the neuropeptides in pain mechanisms. In fact, “... it has been increasingly recognized that neuropeptides participate in the processing of information in the nociceptive system not only at the peripheral and spinal but at practically all levels of the central nervous system (CNS)” (Hökfelt et al., 1994b).

One of the neuropeptides firstly involved in pain mechanisms was substance P (SP) (Henry, 1976; 1994). Its release from peripheral nerve endings of primary afferent neurons during neurogenic inflammation produces an “inflammatory soup” (Lang et al., 1990; Handwerker and Reeh, 1991), stimulating even more peptidergic mast cell secretion (Lembeck and Gamse, 1982), vasodilation and plasma extravasation (Brain and Williams, 1985; 1988). More recently, elegant morphological (Nichols et al., 1999; Todd et al., 2000) and functional descriptions support the role of SP (Nichols et al., 1999; Khasabov et al., 2002) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Seybold et al., 2003) in spinal pain processing and posterior transmission to upper levels of the CNS (Henry, 1994; Mantyh, 2002).

At present, the focus has been directed towards two other neuropeptides: Galanin (Gal) (Liu and Hökfelt, 2002) and the Neuropeptide tyrosine (NPY) (Hökfelt et al., 1994b; Ossipov et al., 2002; Silva et al., 2002). Nevertheless, and even after 20 years of intense work, the debate around the role of these and other peptides in the generation and/or attenuation of pain still persists.



*Dissecting a chronic pain model*

**NPYergic system**

Several pain models exist based on peripheral nerve injury, including nerve cut and constriction. In the present thesis, we have studied the significance of the degree of sciatic nerve constriction in rats, and to what extent this manipulation influences changes in peptidergic expression in primary afferent neurons and pain generation. Previous studies have extensively analysed the effect of partial nerve lesions on pain behavior. Thus, the chronic constriction injury (CCI) (Bennett and Xie, 1988), partial axotomy (Seltzer et al., 1990), ischaemia (Gazelius et al., 1996), or the selective cut of some of the sciatic nerve branches (Decosterd and Woolf, 2000), dramatically affect pain perception, and induce intense changes in the expression of diverse neuropeptides produced in dorsal root ganglion (DRG) neurons (Noguchi et al., 1993; Nahin et al., 1994; Ma and Bisby, 1997; 1998a; 1998b). In fact, CCI induces a similar increase of NPY in DRG neurons as seen after axotomy (Ma and Bisby, 1998a).

The four loose ligatures around the sciatic nerve used in the CCI model induce a degree of constriction ranging from 25 to 75% of the diameter of the nerve (Bennett and Xie, 1988). This variability in the intensity of nerve injury could induce differential effects in the phenotype of primary afferent neurons as well as in pain behavior. In fact, even the degeneration of myelinated and unmyelinated fibers would depend on the degree of sciatic nerve lesion (see Mosconi and Kruger, 1996, and references therein). Thus, we developed a new variant of the Bennett model, this time using one single ligature of the sciatic nerve and inducing different degrees of constriction. We have studied the effects of such a lesion on the expression of NPY and the NPY Y1 receptor (Y1R) in lumbar DRG neurons and spinal cord. Briefly, we observed changes directly related to the degree of constriction of the sciatic nerve: the higher the degree of

constriction, the more dramatic the upregulation and downregulation observed for NPY and the Y1R, respectively (Fig., V. 2, 3, 4). Changes in the expression of NPY after CCI were previously described (Nahin et al., 1994; Ma and Bisby, 1997; 1998a, b), but this is the first report monitoring the effect of different degrees of constriction on the expression of the Y1R. We could observe a considerable decrease in number of Y1R neuron profiles (NPs), which for the most severe lesions (axotomy and ‘strong’ SLNC) persisted in time. However, a ‘medium’ SLNC exhibited a decreased number of Y1R immunoreactive (IR) NPs compared to the contralateral side. In parallel, the ‘medium’ SLNC group also developed the strongest mechanical allodynia comparing the different groups (Fig. V. 6), in accordance with previous observations using the Bennett model (Bennett and Xie, 1988; Kim et al., 1997; Pitcher et al., 1999). Thus, the phenotypic changes observed after the SLNCs could be related to the mechanisms leading to pain.

It is well known that peripheral nerve injury alters the excitability of primary afferent neurons (see Millan et al., 1999 for a review). On the other hand, different constrictive lesions significantly affect the morphology of myelinated, and also unmyelinated fibers (Mosconi and Kruger, 1996). This could be important in view of the fact that also  $A\alpha/\beta$  fibers would be able to transmit pain information (Lawson, 2002). Unpublished results (Musolino P, Brumovsky PR, Villar MJ) show that a ‘strong’ SLNC induces dramatic changes in the expression of the myelin basic protein (MBP) in sciatic nerve fibers, reflecting the deleterious effect on myelinated fibers, which is also accompanied by alteration of C fibers (Mosconi y Kruger, 1996). On the other hand ‘medium’ SLNCs also exhibited a moderate but consistent alteration in MBP-IR, and the ‘light’ SLNC induced the smallest changes. The generation of pain in diabetic neuropathic rats, with a strong compromise of myelinated fibers (Khan et al., 2002), suggests their involvement in neuropathic pain physiopathology. In fact, patients

with peripheral neuropathy exhibit stronger alteration in mechanical than thermal sensitivity (Bouhassira et al., 1999; Sieweke et al., 1999). In this context, the increase of NPY in large neurons in the DRGs (producing large myelinated fibers) could be important. Ossipov and colleagues (2003) have shown that in mononeuropathic rats, with an increased transport of NPY from the DRGs towards the brainstem, the use of a Y1R antagonist inhibits neuropathic pain (Ossipov et al., 2003).

Nevertheless, neuropathies affecting myelinated-fibers in human patients do not always induce pain (Nathan, 1976), and a selective lesion of C fibers is unable to generate pain by its own (Simone et al., 1998). All these evidences suggests that myelinated, unmyelinated and even unlesioned fibers (Campbell, 2001; Koltzenburg and Scadding, 2001), altogether have a role in the generation of chronic pain induced by peripheral nerve injury. Indeed, the selective degeneration of motoneuron myelinated fibers induces spontaneous activity in unlesioned afferent C fibers and neuropathic pain (Wu et al., 2002). More studies are necessary to elucidate the relation between the degree of nerve lesion and pain induction in terms of alterations affecting the proportion of myelinated vs. unmyelinated, healthy vs. lesioned fibers.

### **Effect of the sciatic nerve lesions on spinal Y1R expression**

Intense lesions of the sciatic nerve (axotomy and ‘strong’ SLNC) induced a decrease in Y1R expression in lamina II of the dorsal horn (Fig. V.5). This effect could be related to the following mechanisms:

1. An event of functional significance, involving internalization of several Y1R units.

Internalization mechanisms have been extensively studied for the NK1 (SP) receptor (Mantyh et al., 1995; Allen et al., 1999; Honoré et al., 1999) and involves an

intracellular redistribution, from the plasmalemma to the cytoplasm and then back again, as observed after peripheral inflammation (Mantyh et al., 1995; Honoré et al., 1999) or peripheral nerve electrical stimulation (Allen et al., 1999). The prolonged activation of G-protein coupled receptors decreases the sensitivity to the agonist (Bohm et al., 1997). In fact, NPY application induces a rapid internalization of Y1R units expressed in HEK293 cells lasting 30 minutes, after which a slow reincorporation into the membrane occurs. Interestingly, this would not be associated to *de novo* synthesis, but to the recycling of the internalized Y1R molecules (Gicquiaux et al., 2002). In contrast, the Y2R does not exhibit internalization (Gicquiaux et al., 2002). If the decrease in Y1R expression after axotomy in fact reflects an internalization process, must be further investigated.

2. The decrease in Y1R expression could also be due to a dramatic and rapid neuronal death, an event already demonstrated using different techniques for neurons of the dorsal horn after axotomy (Sugimoto et al., 1990; Azkue et al., 1998) or CCI (Sugimoto et al., 1990; Hama et al., 1996; Kawamura et al., 1997; Mao et al., 1997; Whiteside and Munglani, 2001; Moore et al., 2002);
3. Finally, it could also represent a survival mechanism of threatened neurons. The deletion of the Y1R in C57Bl/6 mice prevents neuronal death in lumbar DRGs one week after sciatic nerve axotomy, in comparison to the intense neuronal loss observed in Wt mice (Shi et al., 2001). Thus, in lesioned rats, the decrease in Y1R expression in the DRGs and the dorsal horn could reflect a mechanism to avoid its excessive activation (Shi et al., 2001; Gicquiaux et al., 2002) by the increased

release of NPY from primary afferents, perhaps protecting the neuron from death.

This event could secondarily affect pain transmission (see below).

### **NPY and Pain**

The role of NPY in pain processing is ambiguous. Pronociceptive (Tracey et al., 1995; White, 1997), antinociceptive (Xu et al., 1999; Naveilhan et al., 2001) or even biphasic actions have been shown for this peptide (Xu et al., 1999). In fact, something similar happens in the CNS, where NPY could have pro- and anticonvulsive actions (see Paredes et al., 2003 and references therein).

On the other hand, NPY's role could be simultaneously relevant at the peripheral (Tracey et al., 1995; Naveilhan et al., 2001), spinal (White, 1997; Xu et al., 1999; Naveilhan et al., 2001), and even the supraspinal levels of the nervous system (NS) (Zhang et al., 2000; Ossipov et al., 2002).

In the periphery, NPY modulates the secretion of noradrenaline (NA) from sympathetic nerve endings (Tracey et al., 1995). Thus, induction of pain might occur by alteration of the excitability of sensory nerve endings in the skin (Tracey et al., 1995), which probably express noradrenergic receptors (Shi et al., 2000). Nevertheless, the reduction of neurogenic inflammation, accompanied by decreased SP release from peripheral nerve endings of DRG neurons in Y1R-KO mice, reveals a direct action for NPY onto these fibers acting through the Y1R (Naveilhan et al., 2001).

In the DRGs, changes in the expression of NPY and its receptors after sciatic nerve lesion could affect neuronal excitability (Mantyh et al., 1994; Amir and Devor, 1996). Intraganglionic release of CGRP in trigeminal ganglia (Ulrich-Lai et al., 2001) and SP in DRGs (Huang and Neher, 1996) has been demonstrated. Similarly, NPY and the Y2R, both increased in medium/large and small DRG neurons respectively after

injury, could participate in intraganglionic neuronal transmission in this situation. In fact, the normally excitatory role of the Y2R in DRG neurons is enhanced after axotomy of the sciatic nerve (Abdulla and Smith, 1999a, b). On the contrary, the activation of the Y1R does not lead to changes in the excitability of primary afferent neurons, although a reduction on its action on Na<sup>2+</sup> channels is observed after lesion (Abdulla and Smith, 1999a, b), parallel to a decrease in Y1R expression (Zhang et al., 1994a; 1995a, d).

At the spinal level, the role of the Y1R is less well understood. We observed a decrease of Y1R expression in the lamina II of the dorsal horn of the spinal cord, ipsilateral to a severe lesion of the sciatic nerve. This effect could take place in three different kinds of spinal neurons: *inhibitory* or *excitatory* interneurons, or *projection* neurons. A decrease of Y1R in *inhibitory* interneurons could maintain the inhibitory tone on excitatory interneurons or projection neurons. On the other hand, the reduction of SP release (Duggan et al., 1991) and probably other excitatory neurotransmitters (NTs) from primary afferents to the dorsal horn by NPY, acting through the Y2R (Duggan et al., 1991), and probably because of its ability to inhibit Ca<sup>2+</sup> channels (Toth et al., 1993; Rhim et al., 1997), could collaborate with the antinociceptive spinal efforts after lesion.

However, the Y1R could be decreased in *excitatory* interneurons, resulting in increased spinal activity, probably through projections from superficial laminae interneurons towards deeper laminae neurons (III-V) of the dorsal horn (Duggan et al., 1977; Eckert III et al., 2003). Several Y1R-IR neurons in laminae I-II colocalize somatostatin (SOM) (Zhang et al., 1999). Also, a recent study shows that 97.5% of the axonal endings of local SOM-IR neurons present in laminae I-II coexpress the vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT-2), suggesting that the great majority of these neurons should have glutamate as its main NT (Todd et al., 2003). The decrease of Y1R in

SOM/VGLUT-2 positive neurons could eventually affect their excitability after peripheral nerve injury.

In the present thesis, we describe the presence of several Y1R-IR neurons in deep laminae of the dorsal horn (III-V) (Figs. X.2, 4). Many of them might be interneurons, and further studies are necessary to better define their characteristics. Nevertheless, the presence of the Y1R in deep layers of the dorsal horn arises the question: could these Y1R-IR neurons be projection neurons? In fact, even some of the very intensely Y1R-IR neurons in laminae I-II might also be projection neurons. NK1-IR projection neurons in laminae III-IV receive synaptic contacts from local NPY-IR fibers (Polgár et al., 1999), suggesting by presence either of pre- or postsynaptic NPY receptors or both, the potentially inhibitory role of the Y1R. It remains to be established if the Y1R is present in NK1 neurons. If so, it could reduce the excitatory input from this neurons at supraspinal levels. If a similar decrease in Y1R immunoreactivity occurs on these deep neurons, as observed in laminae II, this could lead to attenuation of the inhibitory capacity of the receptor in chronic pain states. Taken together, more studies are necessary to clarify the phenotype of the deep Y1R-IR neurons, as well as the source and pattern of synaptic contacts that they receive.

Several studies confirm the inhibitory role of NPY acting through the Y1R. Thus, thermal hypersensitivity induced by skin inflammation was reduced after intrathecal (i.t) application of NPY or Y1R agonists (Taiwo and Taylor, 2002). This is in accordance with the increased expression of the Y1R in DRGs and spinal cord after inflammation in rats (Ji et al., 1994). In contrast, White (1997), using the Bennett model, observed that prolonged i.t. application of NPY or Y1R agonists enhance allodynia in neuropathic rats. So far, there is no satisfactory explanation for this divergence in the activity of NPY in chronic pain mechanisms, although it is highly

possible that depends on the kind of receptor being activated (Xu et al., 1999). However, it has been shown that NPY activates G-proteins in two different ways in the cerebral cortex of rat: 1) the ‘classical’ way, acting through the Y1R when NPY concentrations are low (receptor-dependent), or 2) by direct activation of G proteins without receptor participation (receptor-independent), at high NPY concentrations (Odagaki et al., 1999). On the other hand, a single low dose of NPY in non-lesioned rats or after axotomy of the sciatic nerve induces pain, whereas a single high dose reduce pain (Xu et al., 1999). One possible explanation for these contradictory results could be that a chronic i.t. application of NPY or its agonists (when high concentrations of the peptide are probably achieved) would activate the receptor-independent pathway, a likely rare phenomenon after single injections of the peptide. So far, only receptor-independent activation of Gi/o proteins has been described for NPY. However, the possibility of activation of stimulatory G proteins has to be considered, as well as other intracellular pathways leading to an increase in neuronal excitability.

### *Galaninergic System*

#### **Role of Galanin in pain: an inhibitory and excitatory peptide**

The precise role of Galanin (Gal) in pain processing has been elusive to our understanding for several years. On one hand, Gal inhibits the flexor reflex at high doses in non-lesioned rats (Yanagisawa et al., 1986; Cridland and Henry, 1988; Post et al., 1988; Wiesenfeld-Hallin et al., 1988). On the other hand, the facilitatory role at low doses (Wiesenfeld-Hallin et al., 1988, 1989a, b; Kuraishi et al., 1991), and the unexpected observations made by Kerr and cols. (2000) showing that Gal-KO mice exhibit a reduced response to pain, generated more doubts than certainties.



The discovery of different Gal-receptor subtypes (Branchek et al., 2000) and the generation of specific agonists for them allowed us to uncover the fine processing that Gal has over pain processing (see chapter VI). Using a GalR2 selective agonist (AR-M1896) and another non-selective GalR1 and -R2 peptide (AR-M961) (Table VI.1) we observed that, in normal rats, both agonists induce pain (Fig. VI.1). However, after peripheral nerve lesion, Gal acting through the GalR1 acquires an antinociceptive capacity. Thus, in neuropathic rats, the application of AR-M961 induced analgesia, whereas AR-M1896 lacked any effect (Fig. VI.2). These events might be better understood if we consider the changes observed for Gal and its receptors after axotomy (and presumably after constrictive lesions). After axotomy, GalR1 and -R2 are downregulated in DRG neurons (Xu et al., 1996b; Shi et al., 1997; Zhang et al., 1998b), presumably being followed by a reduction of their (both or one of them) transport towards the spinal cord, which is paralleled by a reduction of Gal binding in primary afferences in the dorsal horn (Kar and Quirion, 1992). Interestingly, no changes were detected in GalR1 expression in local neurons of the dorsal horn (Zhang et al., 1998b). All this suggests that, after lesion, a potentiation of the antinociceptive role of Gal occurs at the spinal level, acting through activation of GalR1 and subsequent intracellular pathways leading to a depression in neuronal excitability. On the contrary, GalR2 activation in normal conditions, or after skin inflammation, when its expression is increased in the DRGs (Xu et al., 1996c), as is Gal in DRGs and dorsal horn local interneurons (Ji et al., 1995), would favour a proalgesic effect of Gal. Possibly, GalR2, acting as an autoreceptor in primary afferents, enhances the release of excitatory NTs. Nevertheless, Gal could also act in the DRGs, modulating neuronal excitability (Liu and Hökfelt, 2002).

Several electrophysiology studies support our results. Flatters and cols. (2002; 2003) have shown that different i.t. doses of exogenous Gal exert an excitatory or inhibitory effect, depending on the condition of the treated animal (unlesioned = pain vs. neuropathic = antinociception). Also, the activity of wide dynamic range neurons in deep laminae of the lumbar dorsal horn is significantly reduced after the i.t. application of Gal in neuropathic rats (Xu et al., 2000a). Also, studies on GalR1-KO mice showed a moderate increase in thermal sensitivity, even higher after the partial lesion of the sciatic nerve, compared to Wt mice (Hygge-Blakeman et al., 2003). Finally, the i.t. application of GalR1 antisense oligonucleotides reduced the inhibitory capacity of Gal over the flexor reflex (Pooga et al., 1998; Rezaei et al., 2001). All these evidences point to an antinociceptive role for Gal when acting through the GalR1 present in local interneurons of the dorsal horn (Liu et al., 2001; Liu and Hökfelt, 2002). More studies are necessary to show, if GalR1 is also present in pain projection neurons.

### **Selective Gal overexpression in primary afferent neurons has an analgesic effect**

In the present thesis, we have shown the immunohistochemical profile of GalOE dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) mice (Steiner et al., 2001), in different peripheral (DRGs; superior cervical ganglia (SCGs); nerve endings in skin) and central (spinal cord) nerve tissues. These mice have an extra copy of the Gal gene linked to the DBH promoter, meaning that all noradrenergic neurons should express/overexpress Gal (Crawley et al., 2002). However, and with surprise, we observed that the transgenic mice showed an increased expression of Gal in small, medium and some large L5 DRG NPs, compared to the Wt mice (Figs. IX.3, 7, 9). A large percentage of the small Gal-IR NPs coexpressed CGRP, whereas a few larger NPs colocalized both peptides in GalOE (DBH) mice (Figs., IX.4, 5, 6). Axotomy of the sciatic nerve induced a dramatic

increase of Gal-IR NPs of all sizes, both in Wt and GalOE (DBH) mice (Figs. IX.9, 10). The magnitude of the increase in small neurons did not differ between Wt and transgenic mice, being very marked for both in comparison to the contralateral side (Fig. IX.10). On the contrary, a moderate increase of Gal was observed in medium and large neurons, of Wt mice, which usually do not display Gal immunoreactivity in this subpopulation of neurons (as indicated above, GalOE mice already express Gal in around 5% of the medium and large NPs, of the total of DRG NPs; Fig. IX.10).

In the superficial dorsal horn of GalOE (DBH) and Wt mice, the expression of Gal was very similar (Fig. IX.11), and we observed an increased number of Gal-IR fibrous profiles in the ventral horn of the transgenic mice, possibly of supraspinal origin (Fig. IX.12). However, double staining experiments for Gal and serotonin (5-HT), a marker for a population of descending supraspinal fibers (Dahlstrom and Fuxe, 1965) showed virtually no colocalization (Fig. IX.12).

In the hindpaw skin, GalOE (DBH) mice exhibited numerous Gal-IR fibers in the sweat glands not seen in Wt mice (Fig. IX.8). Finally, and in comparison to the Wt mice, the expression of Gal in the SCG of GalOE (DBH) mice was several times higher, both in number of Gal-IR NPs and the intensity of immunoreactivity (Fig. IX.6).

All the above described observations were confirmed using *in situ* hybridization techniques (Fig. IX.7).

The considerable expression of Gal in different sizes of DRG neurons of GalOE (DBH) mice is surprising and opens several questions, since primary afferent neurons are not supposed to produce noradrenaline. Only a subpopulation of DRG neurons, mainly small, express another enzyme, the tyrosine hydroxylase (TH) (Fig. IX.5, 6). Nevertheless, we only detected very few TH/Gal-IR neurons in GalOE (DBH) mice. One possible explanation could be that the genetic manipulation of these mice, and the

possibility of cross-linking of the extra copy of Gal to another promoter during the process of combination and division of the stem cells used to transfect the peptide into a female mouse, induced the ectopic expression of Gal.

GalOE (DBH) mice exhibit a certain protection against pain, which is potentiated after partial sciatic nerve lesion (Hygge-Blakeman et al., 2003b) (Figs. IX.1, 2). Just as for our mice, an inhibitory role of Gal in pain mechanisms has been observed in two other lines of transgenic mice that overexpress the peptide:

- GalOE mice under control of the platelet derived growth factor- $\beta$  (PDGF-b) promoter, and with a wide ectopic overexpression (Hygge-Blakeman et al., 2001),

- GalOE mice that constitutively overexpress high levels of Gal in DRGs and the spinal cord, under the control of the 12-kb flanking regulatory sequences of the murine *c-Ret* gene (RET-OE)) (Sukumaran et al., 2001; Holmes et al., 2003). In the DRGs, the 12-kb *c-Ret* enhancer region has been shown to target isolectin B (IB4) (Sukumaran et al., 2001).

In common with our own results, the expression of Gal in the above described mice was observed in small and also in large neurons (Holmes et al., 2003; Hygge-Blakeman et al., 2001). Holmes and cols. (2003) observed that the more intensely Gal-IR neurons in their GalOE (c-RET) mice were IB4-negative, in accordance with previous reports showing that 21% of the c-Ret-positive DRG neurons do not express IB4 and are mainly of large size (Bennett et al., 1998). On the other hand, we observed in the GalOE (DBH) mice that the majority of the medium/large Gal-IR NPs are CGRP-negative, although more studies are necessary to define if these neurons are IB4-negative. Nevertheless, Bergman and cols. (1999) have shown in young adult rats an IB4-/CGRP-negative subpopulation of DRG neurons (Bergman et al., 1999).

To clarify the phenotype and characteristics of these neurons could be important, since it has been shown that IB4-negative DRG neurons project towards lamina I and the external part of lamina II, where a large number of nociceptive projection neurons are found (Bennett et al., 1998). These neurons could potentially express GalR1 and be inhibited by the increased levels of Gal in the GalOE mice (Liu et al., 2001; Liu and Hökfelt, 2002), presumably released from fibers produced by Gal+/IB4-/CGRP- DRG neurons. However, another possibility is that the same large neurons project towards deeper laminae of the spinal cord, acting over GalR1-bearing projection neurons, and reducing their activity.

Finally, GalOE mice could also exhibit changes in the expression of different Gal receptors, affecting their pain perception, but this issue remains to be analysed.

### **The NPY Y1R is transported through axons of primary sensory neurons**

For several years, the Y1R was considered exclusively a somatic receptor, whereas the Y2R would be transported towards the axonal projections of primary afferents neurons (Wahlestedt et al., 1986). Nevertheless, recent reports suggested the presynaptic role of the Y1R in several different neuronal populations of the NS (Peaire et al., 1997; Pickel et al., 1998; St-Pierre et al., 2000; Paredes et al., 2003). Thanks to a potent Y1R antibody and the help of a very sensitive immunohistochemistry kit (TSA plus) (Adams, 1992), we could finally show the presence of the Y1R in axons of lumbar DRG neurons in the adult rat (Fig. VII.1), complementing the observation of the receptor in trigeminal axonal processes in the embryo and newborn rats (Ubink et al., 2001). In fact, we demonstrated the presence of the receptor in peripheral nerve endings in the skin, as well as in afferent fibers to the dorsal horn of the spinal cord (Figs. VII.1;

X. 3). The sciatic nerve crush confirmed the transport of the receptor, by inducing an accumulation proximal to the lesion (Fig., VII.2). If the accumulation exclusively belongs to somatic sensory fibers, or if there is a source of visceral sensorial component, probably from the pelvic parasympathetic plexus, as suggested by the presence of the Y1R in the nodose ganglia (Corp and Smith, 1991; Ghilardi et al., 1994), has not been studied. On the other hand, sympathetic ganglia do not exhibit Y1R expression at detectable levels (Zhang et al., 1997; Matsuda et al., 2002). However, we could observe Y1R and CGRP colocalization in the peripheral projections of the sciatic nerve, even in the epidermis in the skin, certifying the presence of the receptor in somatic sensory fibers (Figs. VII.3, 4).

The expression of the Y1R was apparently higher in the sciatic nerve, in comparison to the dorsal roots (Fig. VII.1). Previous work suggested a differential transport of some peptides in primary afferent neurons, as observed for SP in the guinea pig, with a larger transport towards peripheral nerve endings than into the dorsal root (Brimijoin et al., 1980). Also, the GalOE (DBH) and Wt mice showed a larger number of Gal-IR fibers in the peripheral projections of the DRGs, compared to their central projections (data not shown). This could be due to an intraneuronal mechanism for differential distribution. Thus, more than 30 classes of transporter proteins belonging to the kinesin superfamily (KIF) have been described (Miki et al., 2001). Apparently, every molecule produced by a neuron would be closely related to a specific transporter regulating, for example, velocity and volume to be transported (Miki et al., 2001). However, there are no proofs for a subpopulation of KIFs regulating the axonal or dendritic destiny of a molecule, even less for a peripheral and central direction as it would be the case in the pseudounipolar DRG neurons.

On the other hand, the Y1R epidermal expression in skin and in the dorsal horn was notably less abundant, compared to that observed in the sciatic nerve or even the dorsal roots. The low expression of the Y1R in the dorsal horn could be due to a small transport of the receptor coming from the DRGs. However, the abundant immunoreactivity already present in local Y1R-IR interneurons of laminae I-II could hide the discrete expression of the receptor in fine C-fibers reaching the superficial laminae. In the epidermal layer of the skin, it is possible that the small but continuous transport of the Y1R is under the level of detection, except for some sparsely distributed fibers.

Functionally, the origin of the NPY acting on Y1Rs on the peripheral branches of DRG neurons is partially known. NPY is contained in sympathetic fibers (Lundberg and Tatemoto, 1982; Lundberg et al., 1982; 1983; Ekblad et al., 1984), forming a profuse perivascular plexus in the skin of rat (Weihe et al., 1994), and probably tonically activating the Y1R present in arterioles (see below). However, it has been demonstrated that the Y1R is necessary for the full development of neurogenic inflammation (Naveilhan et al., 2001; Dimitrijevic et al., 2002). Accordingly, an increased release of NPY from sympathetic fibers has been shown during inflammation in rat (Weihe et al., 1994), which could potentially act on Y1R-positive blood vessels and sensory fibers. On the other hand, NPY is able to inhibit the visceral motor response and NT secretion in somatic sensory fibers innervating peripheral tissue (see Ghilardi et al., 1994 and references therein). This action would be related to activation of Y2Rs (Duggan et al., 1991). Therefore, it is possible that NPY has a balancing function, depending on which kind of receptor is activated, the magnitude and place of their activation, or the changes induced in their expression after peripheral nerve lesion or inflammation.

The role of the Y1R in primary afferences is unknown. Its activation could possibly decrease the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Silinsky, 1985; Scholz and Miller, 1992; Chen et al., 1996; McQuiston et al., 1996; Sun et al., 1998), modulating the release of excitatory NTs produced in the DRGs, with the subsequent reduction of pain. In fact, inhibition of SP release from primary afferents in the dorsal horn of the spinal cord, via activation of the Y2R has been described (Duggan et al., 1991). However, a potentiation of L- $\text{Ca}^{2+}$  channel currents has also been described for the Y1R in DRG neurons (Abdulla and Smith, 1999a, b). On the other hand, the NPY could inhibit the axonal transport of several different particles, acting through the Y1- and Y2Rs, as suggested by Hiruma and cols. (2002). Thus, the decrease of the Y1R in small, SP-expressing DRG neurons could contribute to the increased transport of SP and other excitatory NTs towards the central and peripheral branches of primary sensory neurons.

### **Peripheral localization of the Y1R – A parenchymal receptor**

We have studied the expression of the Y1R in the vascular system of the majority of rodent tissues, and found it usually to be present in small arteries and arterioles (up to 200  $\mu\text{m}$  diameter). Also, we observed Y1R expression in some enteroendocrine cells in the stomach mucosa as well as neurons of the myenteric plexus; a considerable number of cells in Langerhans islets in the pancreas (many colocalizing somatostatin); in chromaffin cells of the adrenal medulla, in striated muscle cells of the rat auricle, in collecting tubule cells of the renal papillae and in some epithelial cells of the seminal vesicle. Interestingly, several small sized blood vessels in the thyroid gland, probably capillaries, also exhibited detectable levels of Y1R expression (Figs. VIII.1-8).

Several studies have described the actions of NPY in different organs. However, not in all cases have our morphological results perfectly matched those based on a



pharmacologic/functional approach. On the other hand, we have detected Y1R expression in blood vessels of organs, where it has not been previously described and surprisingly, we could also see it in some parenchymal cells. We have taken special care in performing different specificity tests. Thus, we preadsorbed our Y1R antibody with the immunogenic peptide and applied it to all tissue under analysis, both in rats and mice. Y1R staining was completely blocked when using the preadsorbed antibody, with the exception of blood cells, both in mouse and rat. Fortunately, our antibody raised against the C-terminal portion of the Y1R cross-reacts with the mouse receptor, although the staining intensity was somewhat lower in mouse than in rat. This could be due to the structural difference in the C-terminal sequence of the Y1R between rats and mice. On the other hand, it is also important to remember the existence of a truncated version of the Y1R, as observed in mice (Nakamura et al., 1995). Another specificity test consisted in screening Y1R expression in Y1R-KO mice tissue (Pedrazzini et al., 1998), comparing the results with those obtained in Wt mice. We observed that the staining was completely absent in Y1R-KO mice (except in blood cells). Finally, previous studies showed correlation between immunohistochemical and in situ hybridization studies for the expression of Y1R in mouse and rat brain (Kopp et al., 2002).

We found Y1R expression in almost all studied vascular beds, present in arteries with a diameter below 200  $\mu\text{m}$ . The Y1R is not fundamental in the maintenance of blood pressure in homeostatic normal conditions, although it could modulate the sympathetic tonus (Pedrazzini et al., 1998), facilitating the vasoconstrictor effect of noradrenaline (Wahlestedt et al., 1985). This could be achieved through the increase in the number of  $\alpha$ -adrenergic receptors in the plasma membrane of blood vessel cells, recruited by the NPY (Holtbäck et al., 1999), perhaps acting on Y1Rs. However, a

vasodilator effect of NPY in cerebral endothelium has also been described (You et al., 2001). It is possible that the abundant expression of the Y1R in blood vessels of different diameter (not larger than 200 $\mu$ m) in several organs could collaborate to the fine modulation of blood circulation.

In the thyroid gland, as well as in small arteries, we have detected Y1R immunoreactivity in several very small vessels which lacked the  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). The expression of  $\alpha$ -SMA has been shown to be limited to the pre- and postcapillary beds, but not in the middle capillaries (Niehls and Drenckhahn, 1991). Thus, the expression of the Y1R observed here in small vessels could correspond to capillaries, a localization never shown before for the Y1R. However, these vessels could express a different kind of smooth muscle actin, as it happens for the different myosin isoforms in arteries of different diameter and capillaries in the brain (Hoya et al., 2003). It would be interesting to know if the Y1R is present in pericytes surrounding the supposed capillaries. The receptor could have some kind of vasomotor function, acting on these cells, although the presence of a contractile machinery in pericytes does not guarantee such a role (Bandopadhyay et al., 2001). Actually, it is possible that the role of pericytes and endothelial cells is of less importance in vasoconstriction compared to other processes, such as permeability. Thus, in the microvascular endothelium of rat, NPY reduces the permeability to macromolecules, as well as the intracellular content of cAMP, acting through a Gi/o protein (Noll et al., 1996). Y1R activation in the arterial and capillary endothelium of the thyroid gland could even contribute to the regulation of the release of thyroxine hormone in situations of increased metabolic rate, as it is observed during stress, where an important raise in NPY concentrations in blood also occurs (Pernow et al., 1986; Castagne et al., 1987; Morris et al., 1987; Zukowska-Grojec et al., 1996).

The presence of the Y1R in the collecting tubule of the renal papillae suggests its participation in processes such as glomerular filtration and natriuresis after activation by NPY (Echtenkamp and Dandridge, 1989; Persson et al., 1991). It has been shown that NPY regulates the activity of the kidney  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase pump along with noradrenaline, probable through Y2Rs (Ohtomo et al., 1994). However, recent studies show a double stimulatory effect on the  $\text{Na}^+$  reuptake by the inhibition of the blocking action that the  $\beta$ -adrenergic receptors have over the  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase pump on one hand, and the stimulation of the positive action that  $\alpha$ -adrenergic receptors have over this pump on the other hand (Holtbäck et al., 1998). This double effect could be related to the activation of two different types of NPY receptor, namely the Y1- and Y2Rs.

Finally, several Y1R-IR chromaffin cells were detected, either colocalizing the NPY, the enzyme phenylethanolamine *N*-methyltransferase (PNMT), or just positive for the receptor. The coexpression of the Y1R with NPY suggests its role as an autoreceptor, controlling the release of the peptide. Also, the expression of PNMT in Y1R-IR neurons indicates that NPY could affect the secretion of adrenaline from chromaffin cells. It is very likely that NPY/PNMT/Y1R-IR cells also exist, suggesting that adrenaline release could be directly modulated by the action of NPY co-released by the same cell and acting through Y1-autoreceptors. In fact, it has been shown that the expression of Y1R and catecholamine transcripts in the adrenal medulla are increased during prolonged exercise under stress conditions (Hiremagalur et al., 1994; Levenson and Moore, 1998) or after low intensity exercise (Erdem et al., 2002), perhaps reflecting an increased NPYergic tone modulating the activity of catecholamines activity. Indeed, the activation of Y1Rs in the rat adrenal medulla enhances catecholamine synthesis (Nussdorfer and Gottardo, 1998), as well as the expression of the TH transcript (Hong et al., 1995).

## Conclusions

The understanding of the role that neuropeptides are playing in neural processes has become increasingly clear during the last 50 years, including their relation to the main NTs in the different neuronal systems in the CNS and PNS (e.g. glutamate, aspartate, acetylcholine, GABA and glycine as well as catecholamines and serotonin). However, the abundant expression that many of the neuropeptides display in most neurons, the large number of receptors to which they bind, and their colocalization pattern with almost any main NT, have suggested an auxiliary role in neural functions. In fact, the fine regulation that the neuropeptides exert in relation to the activity of the main NTs may represent an important mechanism for the correct transmission of electric signalling between neurons and on to other target tissues.

Intense work in many laboratories have explored the variety of functions of neuropeptides, including processes so different as memory, cardiovascular motor modulation, as well as pain or mental diseases. In the present thesis, we have focused on the participation of certain neuropeptides and their receptors in pain mechanisms. It is possible that the principal site of action of neuropeptides in this respect is the dorsal horn of the spinal cord, where most of the nociceptive information is relayed towards higher processing levels. This is an ideal arena for the modulation of the activity of primary afferent fibers and projection neurons. However, the expression of many neuropeptides and receptors in the DRGs and the skin suggest a role also in the periphery or even in the ganglia themselves.

Several aspects on the galaninergic and NPYergic systems have been analyzed in this thesis, partly based on transgene techniques and some drugs selective for different neuropeptide receptors. Nevertheless, many questions still remain, for example how a certain receptor could couple to different intracellular pathways and/or ion

channels, as well as the consequences of the activation of a receptor in a particular tissue. It is interesting that, depending on the kind of cell as well as the intracellular pathway to which a receptor is coupled, the consequences of its activation could have a stimulatory or inhibitory effect (Van Liefde et al., 1998; Li et al., 2002).

It is intriguing that Gal and NPY, both analyzed in the present thesis, are upregulated in different DRG neuronal populations (Gal in small neurons; NPY in large neurons) after peripheral nerve lesion. Both exhibit excitatory and inhibitory actions on the activity of DRG and the dorsal horn neurons. The interplay induced by the lesion of a peripheral nerve and the expression of different subtypes of receptors, could be fundamental for the biphasic activity that Gal and NPY display, possibly affecting the maintenance and/or inhibition of chronic pain.

To better understand the role of neuropeptides in pain processing, having in mind the development of new therapeutic approaches, it is necessary to study the relation that neuropeptides have with other important molecules produced in the DRGs and the spinal cord, also greatly affected by peripheral nerve lesions. In this sense, the concerted activation and/or inhibition of receptors for different NTs, including Gal and NPY, could be one alternative way to treat chronic and debilitating pain.

# Proyectos

**Efecto de una compresión única graduada del nervio ciático de la rata en la conducta de dolor y la expresión de NPY y el RY1 en neuronas del GARD y la médula espinal**

## Introducción

La injuria por compresión crónica (ICC) (Bennett y Xie, 1988) o la axotomía del nervio ciático (Wall y Gutnick, 1979; Wall et al., 1979) son dos de los modelos animales que más se han utilizado para el estudio del dolor inducido por lesión de un nervio periférico. Estas lesiones se caracterizan por producir cambios fenotípicos importantes en los neuropéptidos producidos en neuronas sensoriales primarias, sugiriendo un rol potencial en la estimulación o atenuación del dolor generado por la lesión de un nervio periférico.

El NPY, es uno de los neuropéptidos con mayor distribución en el SNC (Wall y Gutnick, 1979; Wall et al., 1979; Allen et al., 1983a; Chronwall et al., 1985; de Quidt y Emson, 1986a, b), y se halla presente en numerosas áreas del SNP (Lundberg et al., 1983; Mutt et al., 1989; Allen y Koenig, 1990). Normalmente, no se observan niveles detectables de inmunoreactividad para NPY en neuronas aferentes primarias (Gibson et al., 1984a; Wakisaka et al., 1991; 1992; Zhang et al., 1993a; Nahin et al., 1994; Ohara et al., 1994). Por el contrario, es común observar en el asta dorsal de la médula espinal un plexo fibroso NPY-IR abundante, con origen en neuronas locales de las láminas I y II (Gibson et al., 1984a). Tanto la rizotomía dorsal como la lesión de los fascículos dorsolaterales en ratas normales no alteran la expresión de NPY en las láminas superficiales del asta dorsal, reforzando el concepto del origen local del péptido (Ossipov et al., 2002). Sin embargo, es probable que exista un pequeño aporte de haces descendentes bulboespinales (Holets et al., 1988).

El RY1 del NPY se expresa en alrededor del 25% de todas las neuronas presentes en los GARDs lumbares. Se trata de neuronas pequeñas y algunas medianas (Zhang et al., 1994a, b; 1999). La gran mayoría de estas neuronas produce también



CGRP y frecuentemente SP (Zhang et al., 1994a, b). Mientras tanto, el RY2 del NPY se halla en neuronas grandes y CGRP-IR de los GARDs (Zhang et al., 1997). En el asta dorsal de la médula espinal lumbar se observa normalmente una considerable inmunoreactividad para el RY1 en la parte interna de la lámina II (Zhang et al., 1994b; 1999).

La axotomía del nervio ciático incrementa la expresión del NPY en neuronas de los GARDs lumbares (Wakisaka et al., 1991; Frisé et al., 1992; Wakisaka et al., 1992; Ohara et al., 1994), reflejo del aumento en los niveles de su ARNm tanto en la rata (Noguchi et al., 1993) como el ratón (Corness et al., 1996; Shi et al., 1998). Este aumento ocurre principalmente en neuronas grandes y medianas, con el consecuente incremento del transporte centrífugo del péptido hacia las terminales centrales llegadas a las láminas más profundas del asta dorsal (III-V) (Wakisaka et al., 1991; 1992; Zhang et al., 1995b) y el núcleo delgado del bulbo raquídeo (Zhang et al., 1993a; Ma y Bisby, 1998a; Li et al., 1999; Ossipov et al., 2002). El incremento en la expresión del NPY en una subpoblación de neuronas pequeñas de los GARDs, ocasiona además un aumento de su inmunoreactividad en las láminas I-II (Zhang et al., 1995b). La rizotomía dorsal previene tanto los efectos espinales (Ohara et al., 1994) como los bulbares (Li et al., 1999; Ossipov et al., 2002).

Por el contrario, se observa una reducción en los niveles del mensajero del RY1 en los GARDs, principalmente en neuronas pequeñas, luego de la axotomía del nervio ciático (Zhang et al., 1994a; 1995d), mientras que el número de neuronas grandes y pequeñas que expresan el RY2 aumenta (Zhang et al., 1997; Landry et al., 2000). Por otro lado, la rizotomía dorsal de 12 días de evolución no induce cambios significativos en la expresión del RY1 en la lámina II del asta dorsal (Brumovsky et al., 2002). Asimismo, la axotomía del nervio ciático parece no afectar la expresión del mensajero

(Zhang et al., 1994a) o la proteína del RY1 (Nazli y Morris, 2000) en las interneuronas presentes en la lámina II (Zhang et al., 1994a; Nazli y Morris, 2000).

La ICC (Bennett y Xie, 1988) induce cambios en los niveles del ARNm para NPY (Nahin et al., 1994; Shi et al., 1999) así como la expresión de su proteína (Wakisaka et al., 1992; Munglani et al., 1995; Ma y Bisby, 1998a; Shi et al., 1999), con un aumento en neuronas grandes y medianas de los GARDs lumbares. En la médula espinal, se observó un incremento paralelo de la inmunoreactividad para NPY en las láminas I a V (Wakisaka et al., 1992; Mark et al., 1998; Shi et al., 1999).

La ICC del nervio ciático de la rata ocasiona hiperalgesia térmica y mecánica, así como también alodinia mecánica y al frío, iniciándose por lo general dos días después de la lesión, con una duración aproximada de 80 días, antes de iniciar un lento proceso de recuperación (Bennett y Xie, 1988; Attal et al., 1990; Coggeshall et al., 1993; Kim et al., 1997; Pitcher et al., 1999; Obata et al., 2003). Resultados similares fueron obtenidos en ratón (Sommer y Schäfers, 1998a). La mayoría de los cambios neuroquímicos observados en los GARDs y la médula espinal lumbares se han estudiado 7 a 28 días luego de ICC (Sugimoto et al., 1990; Cameron et al., 1991; Garrison et al., 1993; Nahin et al., 1994; Munglani et al., 1995; Ma y Bisby, 1997; 1998a), aunque algunos cambios persisten más allá de este período (Munglani et al., 1996).

Hasta el momento, el rol del NPY y sus receptores en la generación, mantenimiento y/o atenuación del dolor luego de la lesión de un nervio periférico continua siendo motivo de discusión. Por un lado, se ha indicado un rol analgésico para el RY1 luego de estudios realizados en ratones knock-out para este receptor (Naveilhan et al., 2001). Por el otro, se ha reportado la inducción de dolor neuropático (White,

1997), o un efecto bifásico en ratas normales o con axotomía luego de la inyección intratecal de NPY (Xu et al., 1999).

En este contexto, desarrollamos una versión modificada del modelo de Bennett de lesión de un nervio periférico, mediante la compresión única y graduada del nervio ciático. Analizamos la conducta dolorosa y los cambios ocurridos en la expresión del NPY y el RY1, dos marcadores de neuronas grandes y pequeñas, respectivamente. Además, practicamos la axotomía del nervio ciático para comparar los efectos con aquellos producidos por las compresiones. Los cambios fueron monitoreados en los GARDs lumbares 4 y 5, los niveles correspondientes del asta dorsal de la médula espinal y la zona de compresión del nervio a diferentes días de sobrevida. Por su parte, la conducta dolorosa fue analizada entre los días 1 a 14 después de la lesión.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron 102 ratas Wistar y 155 ratas Sprague-Dawley macho (250-300 g de peso) para los experimentos de inmunohistoquímica y conducta dolorosa, respectivamente.

Los animales fueron mantenidos en un ciclo día/noche de 12 horas, con acceso *ad libitum* a comida y agua. Todas las ratas fueron anestesiadas usando pentobarbital (Mebumal; 60 mg/kg., ip.) para realizar cualquier intervención quirúrgica, así como también al momento de practicar la perfusión transcardíaca.

Todas las lesiones practicadas fueron aprobadas por los comités éticos sueco (Stockholms Norra Djurförsöksetiska Namd) (#206/99) y de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (#24/03).

### Compresión Unica de Nervio Periférico (CUNP)

El diámetro del nervio ciático derecho fue reducido en 224 ratas con una ligadura permanente y de grado variable. El nervio fue expuesto a nivel de la parte media del fémur de la pata de la rata, y liberado del tejido conectivo circundante con la ayuda de pinzas finas y microtijeras en una extensión de 5 a 8 mm. A continuación, se colocó una lámina delgada de polietileno (5x5 mm) alrededor de la zona expuesta del nervio y se procedió a la compresión de su diámetro con grados variables, usando un hilo de sutura de seda (3.0) (Barbour Threads, Lisburn, Ireland). Con el grado de compresión como referencia, se dividió a los animales en tres grupos principales (Fig. III.1): 1) con CUNP ‘intensa’ ( $\geq 90\%$  del diámetro del nervio) (n=51), 2) CUNP ‘media’ (40-80% del diámetro del nervio) (n=126) y 3) con CUNP ‘suave’ (10-30% del diámetro del nervio) (n=47), en donde se produjo tan solo retardo del aporte sanguíneo perineural. Las compresiones se realizaron con la ayuda de un microscopio de disección (magnificación, 40 x), y el grado de compresión para cada nervio fue certificado luego del sacrificio y fijación del animal de dos maneras:

- Mediante observación del nervio comprimido usando el microscopio de disección, y con la ayuda de una regla milimetrada,
- y bajo observación microscópica de secciones teñidas del nervio.

Por otro lado, en 23 ratas el nervio ciático derecho fue axotomizado distal a una ligadura intensa. En todos los casos, se extrajeron los primeros 5mm del segmento distal a la sección del nervio, con el objeto de evitar la re-unión del nervio seccionado.

Además, en algunas ratas, se agregó la lámina de polietileno y el hilo de sutura de seda alrededor del nervio ciático, sin inducir compresión (datos no mostrados).

## **Inmunohistoquímica**

**Preparación del tejido.** Después de diferentes tiempos de sobrevida (1, 3, 7, 14, 28 días, 2 y 6 meses), los animales lesionados (n=92) y control (n=10) destinados a experimentos de inmunohistoquímica fueron reanestesiados y perfundidos por vía transcardíaca con 50 ml de buffer Tyrode a 37°C, seguido de 50 ml de una mezcla de 4% de para-formaldehído y 0.2% de ácido pícrico diluïdos en BF 0.16 M (pH 6.9) (Pease, 1962; Zamboni y De Martino, 1967) a 37°C, y finalmente 300 ml del mismo fijador a 4°C. Los lados contra- e ipsilateral de los GARDs L4-5, los nervios ciáticos, así como los niveles correspondientes de la médula espinal lumbar fueron rápidamente disecados e inmersos en el mismo fijador por 90 min a 4°C. Luego, el tejido fue sumergido en sucrosa al 20 % diluída en PBS (pH 7.2) conteniendo 0.01% de azida sódica (Sigma, St Louis, MO, USA) por no menos de 24 h. Se obtuvieron secciones de los distintos tejidos, previamente embebidos en el medio de inclusión de temperatura óptimo para criosecciones (OCT) (Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA), usando un crióstato (Microm, Heidelberg, Germany), a 16 o 20 µm de grosor para los GARDs y la médula espinal, y 14 µm para los nervios.

**Protocolo de incubación.** Las secciones, montadas en portaobjetos gelatinizados con gelatina y alumbre de cromo, fueron procesadas usando el protocolo del complejo avidina-biotina (ABC) (Hsu et al., 1981). Después de lavar en PBS y ser deshidratadas en una secuencia creciente de alcoholes, las secciones fueron sometidas a inactivación de la peroxidasa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.005 %) diluído en metanol, para luego ser re-hidratadas y lavadas dos veces en PBS. Secciones alternadas fueron incubadas en cámaras húmedas a 4°C por 24 h con anticuerpos de conejo dirigidos contra el NPY (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA) o el RY1 (Zhang et al., 1994b) diluïdos 1:4,000 y 1:8,000, respectivamente, en PBS [conteniendo 0.2% de albúmina de suero bovino

(p/v), 0.03% de Triton X-100 (v/v) y 0.1% de azida sódica (p/v)]. Posteriormente, las secciones fueron lavadas dos veces en PBS, e incubadas con anticuerpos secundarios anti-conejo (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A) a TA por 60 min, lavadas dos veces en PBS, e incubadas con los reactivos ABC del kit “Elite” de Vector (Vector Laboratories) por 1 h a TA. La actividad de la peroxidasa fue demostrada por reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando el protocolo de diaminobenzidina intensificada por nickel, con incremento de la señal inmunoreactiva. Luego de deshidratar las secciones, estas fueron cubiertas con cubreobjetos y montadas usando Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey, U.S.A).

Todas las secciones fueron examinadas con un fotomicroscopio Nikon Eclipse E800 dotado con iluminación de campo claro. Para la toma de fotografías, se utilizó film Technical Pan (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA).

**Controles.** Como control de la técnica de inmunohistoquímica, se realizaron incubaciones paralelas de secciones con anticuerpos contra el NPY y el RY1 (con las mismas diluciones indicadas más arriba) prebloqueados con los péptidos inmunogénicos del NPY (Peninsula Laboratories) y el RY1 (Zhang et al., 1994b) respectivamente, y diluïdos a 10<sup>-6</sup> M. Además, se incubaron algunas secciones con el anticuerpo primario o secundario solos, y procesadas como fuera descrito en párrafos anteriores.

### **Conducta dolorosa**

**Test de von Frey.** Los tests de conducta fueron realizados durante el día (9.00-18.00 hs) en una habitación tranquila en 155 ratas Sprague Dawley 1 (n=23), 3 (n=16), 7 (n=16) y 14 (n=100) días luego de la CUNP de grado variable (CUNP ‘intensa’, n=22; CUNP ‘media’, n=106; CUNP ‘suave’, n=27). Los animales fueron ubicados en cubículos

transparentes (8×8×18 cm) apoyados sobre un alambre tejido (tamaño del orificio, 3×3 mm) adaptado a una caja de madera. Luego de 15 a 30 min de adaptación, una serie de filamentos de von Frey (0.88, 1.28, 2.7, 5.1, 7.5, 8.8, 13.5, 23 g) (Stoelting, WoodDale, Illinois, USA) fueron aplicados secuencialmente desde el más suave hasta el más fuerte, y desde abajo hacia el centro de la superficie plantar de la pata posterior del animal para evaluar la alodinia mecánica (Chaplan et al., 1994). Cada filamento fue aplicado tres veces con intervalos de aproximadamente 5s. La retirada brusca de la pata fue tomada como una respuesta positiva para dolor. El mismo proceso fue repetido tres veces para cada pata contra- e ipsilateral, con 5 minutos de espera entre pata estudiada. Se determinó el umbral de dolor en base a la menor fuerza con la que se indujera una respuesta positiva en las tres estimulaciones aplicadas. Asimismo, se consideró umbral de dolor en rango alodínico, aquel obtenido con 5.1 g o menos de fuerza. El límite máximo de fuerza de los pelos utilizados fue de 23 g (fuerza con la que fue posible levantar la pata del animal).

*Autotomía.* La autotomía fue ranqueada de acuerdo a una escala desde 1 a 11, descrita por Wall y cols. (1979).

Luego de los experimentos, los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital y sacrificados por decapitación.

### **Cuantificación**

Se contaron los PNs inmunoreactivos para NPY y el RY1, usando un microscopio de campo claro dotado de un objetivo de 20 x (magnificación total de 200 x). Las secciones de 16 µm de grosor, en donde se realizó el conteo, fueron tomadas al azar en forma sistemática a lo largo de toda la extensión de cada GARD (cada 12<sup>ava</sup> sección, con un total de 5-8 secciones por ganglio). El número total de PNs positivos

para NPY y RY1 fue luego correlacionado con la suma de las áreas de las distintas secciones utilizadas para la cuantificación (sólo las áreas conteniendo cuerpos celulares fueron consideradas; los haces fibrosos dentro del ganglio fueron excluidos). El cálculo de las áreas fue realizado usando una computadora Macintosh II (Apple Computer, Cupertino, CA, U.S.A) equipada con un Quick Capture frame grabber board (Data Translation, Marlboro, MA, U.S.A) y una cámara CCD Cage-MTI (DAGE-MTI, Michigan City, IN, U.S.A) conectada a un microscopio Nikon. La cuantificación computarizada fue realizada usando el programa NIH Image de dominio público (desarrollado en el National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos de América y accesible en la dirección de Internet <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Así, se obtuvo el número de PNs positivos por 100,000 micrómetros cuadrados de área en los lados contra- e ipsilateral por cada rata, y se calculó el promedio  $\pm$  SEM por grupo para el análisis estadístico final.

### **Estadística**

Las diferencias entre los porcentajes de PNs positivos NPY- y RY1-IR entre los lados contra- e ipsilateral para cada grupo (Axo, CUNP ‘intensa’, ‘media’, y ‘suave’) a cada día de sobrevida fueron testeadas usando el t-test pareado de Student. También, se hicieron comparaciones entre diferentes grupos por cada día de sobrevida, usando el test ANOVA, seguido del test post-hoc Tukey HSD, cuando ANOVA diera significativo.

Por otra parte, se aplicaron tests no-paramétricos para el estudio del efecto de las diferentes lesiones en la conducta dolorosa. Así, la comparación entre los lados contra- e ipsilateral a la lesión fue analizada usando el test pareado de Wilcoxon. El test de Kruskal-Wallis se utilizó para evaluar los efectos de las lesiones en cada una de las



sobrevidas, y cuando se obtuvo un resultado significativo, se realizaron comparaciones entre grupos con el U test de Mann-Whitney.

El nivel de significancia en los gráficos obtenidos se expresó de la siguiente manera: \* valor de  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

## **Resultados**

### ***Nervio ciático***

Todos los nervios comprimidos mostraron signos de reducción de sus diámetros en función del grado de compresión (Fig. V.1). Además, se pudo observar hinchazón en el extremo proximal de la compresión (Fig. V.1). Sólo se observó transparencia en el sitio de compresión en nervios con CUNP '*intensa*' (Fig. V.1a) o en los casos en los que el grado de compresión alcanzara el 80% del diámetro del nervio o mayor (Fig. V.1b). Con CUNPs más suaves se observó una disminución del diámetro del nervio sin marcada translucidez (Fig. V.1c, d), inclusive luego de sobrevidas más largas. Todos los animales, incluidos aquellos en los que se aplicó el polietileno y la sutura de seda en forma no-constrictiva, mostraron formación de tejido fibroso en el sitio de aplicación, empezando a los 3 días de sobrevida y mayores (resultados no mostrados).

### ***Ganglio anexo a la raíz dorsal***

Tanto el análisis morfológico (Figs. V.2; 3) como los resultados de la cuantificación de PNs inmunoreactivos para NPY y el RY1 (Fig. V.4) mostraron cambios importantes en la expresión de estos dos marcadores en diferentes poblaciones neuronales, con dependencia en el grado de lesión producida.

### Expresión de NPY

En los ganglios control y contralaterales de ratas lesionadas, se observaron PNs NPY-IR aislados (Fig. V.2a), así como fibras perivasculares NPY-IR (Fig. V.2a y recuadro), inclusive en los ganglios ipsilaterales.

Todos los animales con CUNP mostraron un aumento ipsilateral en el número de PNs grandes y medianos NPY-IR, también detectado en algunas neuronas pequeñas que se correspondió con el grado de compresión (Figs. V.2b-d, f; 4a). La señal varió desde una tinción celular granular de tipo Golgi muy suave, hasta neuronas intensamente teñidas con NPY (Fig. V.2f). El aumento se observó ya el primer día, en particular después de axotomía y CUNP '*intensa*' (Fig. V.4a). Desde el tercer día (resultados no mostrados) en adelante, los efectos fueron dramáticos, con el aumento más marcado observado para axotomía y la CUNP '*intensa*' en todas las sobrevidas estudiadas (Figs. V.2d-f, 4a). Por su parte, la CUNP '*media*' indujo un considerable aumento en el número de PNs NPY-positivos, alcanzando cantidades similares a las obtenidas con axotomía o CUNP '*intensa*', aunque sólo luego de 14 días de sobrevida (Figs. V.2c, e; 4a). La CUNP '*suave*' también indujo un pequeño aumento en el número de PNs NPY-IR, manteniéndose inclusive hasta después de 28 días de sobrevida (Fig. V.4a).

Con sobrevidas más largas, sólo las ratas axotomizadas o con CUNP '*intensa*' mantuvieron números elevados de PNs NPY-IR, mientras que con las CUNPs '*media*' y '*suave*' se observaron valores en descenso (Fig. V. 4a). Inclusive, después de dos y seis meses se pudo observar que axotomía y CUNP '*intensa*' mantuvieron números altos de PNs NPY-IR respecto de los controles (resultados no publicados).

### Expresión del RY1

Tanto en los GARDs L4-5 control como en los contralaterales de animales lesionados se observaron varios PNs RY1-IR (Fig. V.3a). Típicamente, se observó al receptor en la membrana plasmática de neuronas pequeñas y medianas (Fig. V.3a). La CUNP ‘intensa’ indujo una marcada disminución en el número de PNs RY1-IR en el lado ipsilateral a la lesión del nervio, en comparación con el lado contralateral en todas las sobrevidas estudiadas (Figs. V.3e; 4b). Por otro lado, la CUNP ‘media’ mostró una disminución significativa de la inmunoreactividad para el RY1 entre los 7 y 14 días de sobrevida (Figs. V.3c; 4b), mientras que la CUNP ‘suave’ indujo los cambios más discretos en comparación con el lado contralateral (Figs. V.3b; 4b). La axotomía y la CUNP ‘intensa’ mostraron una disminución similar en el número de PNs RY1-IR (Figs. V.3f; 4b), y luego de 14 y 28 días de sobrevida, muy pocas neuronas positivas fueron detectadas (Figs. V.3e, f; 4b).

### *Niveles lumbares 4-5 del asta dorsal de la médula espinal*

#### Expresión del NPY y el RY1

Todos los animales en los que se practicó axotomía o CUNP ‘intensa’ de sus nervios ciáticos, mostraron un aumento ipsilateral considerable de fibras NPY-IR en el área media de las láminas I-IV, empezando a los 7 días de sobrevida (Fig. V.5a, b). La CUNP ‘suave’ no indujo cambios detectables mientras que la CUNP ‘media’ produjo un incremento muy pequeño sólo luego de sobrevidas muy largas (resultados no mostrados).

Alrededor de la mitad de las ratas con CUNP ‘intensa’ mostraron una disminución ipsilateral de la inmunoreactividad para el RY1 en toda la parte interna de la lámina II, especialmente después de 14 días y sobrevidas más largas (Fig. V.5c, d).

Tales cambios no fueron detectados con las CUNPs ‘*media*’ o ‘*suave*’ (resultados no mostrados). Por su parte, la axotomía indujo una disminución en la inmunoreactividad para el RY1 en la lámina II similar a la observada con la CUNP ‘*intensa*’ (Fig. V.5e, f).

### ***Controles***

Los patrones de tinción descriptos más arriba fueron bloqueados en secciones incubadas con anticuerpos dirigidos contra el NPY o el RY1 absorbidos con los respectivos péptidos o luego de omitir los anticuerpos primarios y secundarios.

En cuanto a los animales en los que se aplicó la lámina de polietileno más la ligadura, pero sin efectuar una lesión constrictiva, no se detectaron cambios en la expresión del NPY o el RY1, a excepción de una rata en la que se observó un ligero aumento en la cantidad de PNs NPY-IRs, similar al observado para las ratas con CUNP ‘*suave*’ (resultados no mostrados).

### ***Tests Conductuales***

Los signos de dolor espontáneo fueron analizados 1, 3, 7 y 14 días después de la lesión. Todas las ratas con CUNP ‘*intensa*’, varias con CUNP ‘*media*’ y muy pocas con CUNP ‘*suave*’ exhibieron protección de la pata afectada e incurvación ungueal. Tan sólo las ratas con axotomía mostraron signos de autotomía. En una sólo rata de este grupo se observó autotomía de grado “8” a los 14 días de sobrevida, mientras que el resto varió entre los grados “1” y “8”.

Usando el test de von Frey a los 14 días de sobrevida, observamos que las ratas con CUNP ‘*intensa*’ no desarrollaron signos de alodinia, con la excepción de 1 de 22 ratas (Fig. V.6a). Casi la totalidad de las ratas con CUNP ‘*media*’ (n=51) fueron afectadas significativamente ( $P < 0.001$ ). En este grupo, el 67% de las ratas desarrolló

alodinia ( $\leq 5.1$  g), 25% tuvo una disminución importante en el umbral de dolor, pero sin llegar a niveles alodínicos (7.5-13.5 g) y un 8% mostró cambios leves en el umbral de dolor  $\geq 23$ g) (Fig. V.6a). Del grupo con CUNP ‘suave’, 4 ratas (15%) (n=27) desarrollaron alodinia, mientras que 41% mostró disminución en el umbral de dolor y el 44 % de las ratas no se vió afectada (Fig. V.6a). La comparación entre grupos mostró niveles de significación para las CUNPs ‘intensa’ versus ‘media’ o ‘suave’ ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ , respectivamente) y ‘media’ versus ‘suave’ ( $P < 0.001$ ).

Por otro lado, el análisis del efecto de la CUNP ‘media’ en la inducción de dolor a diferentes sobrevidas mostró una significativa disminución en el umbral de dolor desde el primer día ( $P < 0.01$ ), con niveles alodínicos de gran significancia desde el tercer día y hasta el 14<sup>avo</sup> día inclusive (Fig. V.6b).

En la mayoría de las ratas, el lado contralateral, usado como control, no mostró signos de afectación por la lesión en el lado opuesto, a excepción de 7 de 155 ratas (5%) que desarrollaron una sutil disminución del umbral de dolor, mientras que sólo una rata mostró signos consistentes de alodinia (5.1 g). Asimismo, las lesiones no constrictivas usadas como control no indujeron en nuestras manos ningún cambio en el umbral de dolor mecánico ni tampoco alteraciones en la movilidad de la pata tratada (datos no mostrados).

**Fig. V.1.** Microfotografía mostrando diferentes grados de compresión del nervio ciático (el lado distal hacia abajo). De izquierda a derecha: a) CUNP '*intensa*' (90%); b) CUNP '*media*' (70-80%); c) CUNP '*media*' (40-80%); y d) CUNP '*suave*' (10-30%). Nótese que el nervio aparece translúcido sólo cuando la CUNP es cercana al 90% de compresión (b). Después de una CUNP '*intensa*', se puede ver una transparencia total en el sitio de compresión (a). Barra de calibración: 2 mm.

**Fig. V.1.** Photography showing different degrees of constriction of the sciatic nerve (distal side down). From left to right: a) '*strong*' (90%) SLNC; b) '*medium*' (70-80%) SLNC; c) '*medium*' (40-80%) SLNC; and d) '*light*' (10-30%) SLNC. Note that the nerve appears translucent only when the SLNC is close to 90% (b). After '*strong*' SLNC, a complete transparency at the site of constriction can be seen (a). Calibration bar: 2 mm.

**Fig. V.2.** Microfotografías de secciones teñidas con anticuerpo contra NPY mostrando GARDs contra- (a) e ipsilaterales 14 días después de una CUNP '*ligera*' (b), '*media*' (c), o '*suave*' (d, f) o axotomía (e). Neuronas NPY-IR aisladas pueden ser vistas en los GARDs contralaterales (a, cabezas de flecha grande), así como varios vasos sanguíneos rodeados de fibras nerviosas NPY-IR (cabezas de flecha pequeñas y magnificación) de probable origen simpático. Notar el incremento progresivo en el número de PNs NPY-IR con mayores grados de constricción del nervio. El área encuadrada en (d) se muestra con una mayor magnificación en (f). Barra de calibración: 100  $\mu\text{m}$  para (a-e); 25  $\mu\text{m}$  para la inclusión en (a) y para (f).

**Fig. V.2.** Photomicrographs of sections immunostained with NPY antiserum showing contra- (a) and ipsilateral DRGs 14 days after '*light*' (b), '*medium*' (c), or '*strong*' (d, f) SLNC or axotomy (e). Single NPY-IR neurons can be seen in the contralateral DRG (a, large arrowhead), and several blood vessels are surrounded by NPY-IR nerve fibers (small arrowhead and inset) of probable sympathetic origin. Note the progressive increase in the number of NPY-IR NPs with the higher degrees of nerve constriction. Boxed area in (d) is shown at higher magnification in (f). Calibration bar: 100  $\mu\text{m}$  for (a-e); 25  $\mu\text{m}$  for inset in (a) and for (f).

**Fig. V.3.** Microfotografías de secciones teñidas con el anticuerpo contra el RY1, mostrando los GARDs contralateral (a) e ispilaterales 14 días después de una CUNP ‘suave’ (b), ‘media’ (c) o ‘intensa’ (e) o axotomía (f). Notar la disminución en el número de los PNs RY1-IR con grados progresivos de compresión del nervio. Sólo algunas células positivas persisten luego de la axotomía o la CUNP ‘intensa’ (cabezas de flecha pequeña). El área encuadrada en (c) se muestra a una mayor magnificación en (d). Barra de calibración: 100  $\mu\text{m}$  para (a-c) y (e, f); 25  $\mu\text{m}$  para (d).

**Fig. V.3.** Photomicrographs of sections immunostained with Y1R antiserum, showing contralateral (a) and ipsilateral DRGs 14 days after ‘light’ (b), ‘medium’ (c) or ‘strong’ (e) SLNC or axotomy (f). Note the decrease in number of Y1R-IR NPs with progressively increased degrees of constriction. Only a few positive cells are seen after axotomy or ‘strong’ SLNC (arrowheads). Boxed area in (c) is shown at higher magnification in (d). Calibration bars: 100  $\mu\text{m}$  for (a-c) and (e, f); 25  $\mu\text{m}$  for (d).



**Fig. V.4.** Número de PNs NPY- (a) y RY1- (b) IR por unidad de área en los GARDs L4-5 contra- e ipsilateral 1, 7, 14 y 28 días luego de una CUNP ‘suave’, ‘media’ o ‘intensa’ o axotomía. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de PNs positivos para cada marcador. Las diferencias significativas están mostradas a un valor de *P* de 0.05 (\*), 0.01 (\*\*) o 0.001 (\*\*\*).

**Fig. V.4.** Number of NPY- (a) and Y1R- (b) IR NPs per unit area in contra- and ipsilateral L4-5 DRGs 1, 7, 14 and 28 days after a ‘light’, ‘medium’ or ‘strong’ SLNC or axotomy. Statistically significant differences are shown at a *P*-value of 0.05 (\*), 0.01 (\*\*) or 0.001 (\*\*\*).

**Fig. V.5.** Microfotografías de secciones teñidas con anticuerpos contra NPY (a-b) y RY1 (c-f), mostrando los niveles L4-5 contralateral (a, c, e) e ipsilateral (b, d, f) del asta dorsal 7 días (a, b) o 2 meses (c, d) después de una compresión de 90% o luego de 14 días de axotomía (e, f). Se observa un aumento en la expresión del NPY en el neuropilo que ocupa la región media de las láminas profundas del asta dorsal en el lado ipsilateral (cabezas de flecha en b). En contraste, un cierto grado de disminución del RY1 se hace evidente luego de 2 meses de una CUNP ‘intensa’ (c, d) así como después de 14 días de axotomía (e, f). Barra de calibración: 100  $\mu$ m para (a-f).

**Fig. V.5.** Photomicrographs of sections immunostained with NPY (a-b) and Y1R (c-f) antiserum, showing the L4-5 levels of contralateral (a, c, e) and ipsilateral (b, d, f) dorsal horn 7 days (a, b) or 2 months (c, d) after a 70-90% constriction or after 14 days of axotomy (e, f). An increase in NPY-LI in the neuropil in the middle region of the deep layers is observed ipsilaterally (arrowheads in b). In contrast, a small decrease of Y1R-LI can be seen 2 months after ‘strong’ SLNC (c, d) as well as 14 days after axotomy (e, f). Calibration bar: 100  $\mu$ m for (a-f).

**Fig. V.6.** Efecto de las CUNPs del nervio ciático en el desarrollo de alodinia mecánica, 14 días después de diferentes grados de compresión (a) o en el desarrollo de conducta dolorosa 1, 3, 7 y 14 días después de una CUNP de 40-80% (b). Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M. Los valores de *P* indican:  $< 0.01$  (\*\*) and  $< 0.001$  (\*\*\*).

**Fig. V.6.** Effect of SLNC of the sciatic nerve on the development of mechanical allodynia 14 days after different degrees of constriction (a) or on the development of pain behavior 1, 3, 7 and 14 days after a 40-80% constriction (b). Values show mean  $\pm$  S.E.M. *P*-values:  $< 0.01$  (\*\*) and  $< 0.001$  (\*\*\*).

## Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de un modelo de lesión graduada de un nervio periférico. Para ello, practicamos compresiones de diferente intensidad con una sola ligadura alrededor del nervio ciático envuelto con una delgada lámina de polietileno aplicada previamente. Los resultados muestran que, especialmente luego de una CUNP '*media*' (40-80%), se produce una alodinia mecánica de características similares en tiempo e intensidad a las descritas para el modelo de Bennett en ratas (Bennett and Xie, 1988; Attal et al., 1990; Kim et al., 1997; Pitcher et al., 1999). Este grado de compresión es, de hecho, bastante similar al obtenido luego de las cuatro ligaduras empleadas por Bennett, con el cual se describió una compresión de entre 25-75% del diámetro del nervio (Bennett y Xie, 1988). También encontramos cambios similares en la expresión del NPY en los GARDs, como fuera descrito para ICC (ver más adelante). Todas estas evidencias sugieren que este modelo, basado en una compresión '*media*' y única (40-80%), podría utilizarse como método complementario para el estudio de los distintos cambios ocurridos luego de la lesión de neuronas de los GARDs. Asimismo, refuerzan la importancia que tendría el grado de compresión neural sobre los cambios fenotípicos neuronales y de conducta del dolor, en especial cuando ambos intentan ser correlacionados. A su vez, los cambios en la expresión del RY1 (bajando) y su ligando NPY (subiendo) en los GARDs lumbares y el asta dorsal luego de este tipo de lesión podrían estar reflejando alguna relación entre la generación de dolor y los mecanismos en los cuales el NPY espinal (y quizás ganglionar) participan. Sin embargo, debe recordarse que el NPY y el RY1 son tan sólo dos integrantes de un grupo muy grande de moléculas que cambian su expresión luego de la lesión de un nervio periférico (Costigan et al., 2002; Wang et al., 2002; Xiao et al., 2002).

### *Aspectos Metodológicos*

Se ha indicado la posible influencia química del hilo de sutura “chromic cat gut”, normalmente utilizada para reproducir el modelo de Bennett, en el desarrollo de dolor neuropático (Maves et al., 1993; Xu et al., 1996a), por inducción de cambios proinflamatorios (Maves et al., 1993; Sommer et al., 1993; Maves et al., 1994; Wagner y Myers, 1996; Sommer y Schäfers, 1998; Sommer et al., 1998; Xu et al., 1999). Por su parte, Mosconi y Kruger (1996), observaron que para la generación de sensibilización periférica sería necesario el efecto constrictivo. Tal es así que la aplicación de tubuladura de polietileno alrededor del nervio ciático sin la inducción de compresión, e inclusive bandas de polietileno o sutura “chromic cat gut” apoyadas contra el nervio ciático fallaron en producir conducta dolorosa. Sin embargo, el uso de los mencionados materiales y otros como la seda o hilo de sutura dextran para producir ICC fueron efectivos generadores de dolor crónico (Mosconi y Kruger, 1996). Nosotros produjimos una mononeuropatía de grado variable del nervio ciático de la rata con una única ligadura usando hilo de seda 3.0, alrededor de una fina lámina de polietileno rodeando el nervio, para proteger la zona de compresión y evitar la rotura de axones, especialmente luego de la CUNP ‘intensa’. En contraste con otros grados de compresión, la CUNP ‘intensa’ no exhibió alodinia, sugiriendo que en este tipo de lesión se produciría una interrupción del flujo de información de dolor de tipo mecánico.

Asimismo, en algunas ratas aplicamos la lámina de polietileno y el hilo de seda alrededor del nervio sin comprimirlo, pero no observamos cambios sustanciales en la expresión de los marcadores estudiados luego de 14 días de sobrevida (resultados no mostrados), aunque sí se produjo acumulación de tejido fibroso como fuera descripto anteriormente (Bennett y Xie, 1988; Mosconi y Kruger, 1996; Pitcher et al., 1999). Sólo

ratas en las que se practicó la CUNP '*intensa*', o aquellas con un grado de compresión que superara aproximadamente el 80% del diámetro del nervio, mostraron translucidez en la zona de compresión. Esto contrasta con la descripción hecha por Bennett y Xie, quienes observaron un área translúcida en la zona del nervio sometida a las cuatro ligaduras, especialmente luego de sobrevidas prolongadas. En nuestro caso, ni siquiera luego de largas sobrevidas observamos tal efecto, con la excepción de los casos indicados. Es posible que la extensión de la lesión del nervio influya sobre la aparición de translucidez, siendo las SLNCs lesiones mucho más acotadas que una ICC convencional.

Un aspecto del análisis cuantitativo aplicado en este trabajo es si la ligadura única empleada es capaz de causar la pérdida de neuronas en los GARDs. Aquí, no hemos conducido ningún experimento confirmatorio de tal efecto; de hecho, es posible que no se haya hecho nunca para ninguno de los modelos de dolor neuropático. Sin embargo, mediante el uso del método de estereología desarrollado por el grupo de Aarhus (Braendegaard y Gundersen, 1986; Gundersen et al., 1988; Tandrup, 1993), se ha mostrado que la sección completa del nervio ciático a nivel de la parte media del muslo de la rata no causa muerte neuronal significativa durante las 4 primeras semanas luego de la lesión (Tandrup et al., 2000). Esto no nos asegura que esta observación se aplique a nuestro modelo. De hecho, es factible que sí ocurra luego de sobrevidas más largas (2-6 meses) y en especial para las lesiones más severas (Axo, CUNP '*intensa*') (Tandrup et al., 2000). Sin embargo, un análisis piloto del tamaño nuclear de neuronas afectadas por Axo o CUNPs '*media*' e '*intensa*' luego de 14 días de sobrevida (n= 3, 8, 3, respectivamente), no mostró cambios significativos en la distribución del mencionado tamaño. Esta evidencia sugiere que las diferentes lesiones no produjeron muerte neuronal que pudiera afectar significativamente nuestra cuantificación, especialmente

luego de 14 días de sobrevida con las lesiones más severas (Axo y CUNP ‘intensa’) (datos no mostrados).

*Efectos de las diferentes CUNPs en la expresión del NPY y el RY1 en neuronas aferentes primarias*

En los GARDs L4-5 se observó el aumento marcado de los PNs NPY-IR para todos los tipos de compresión realizados, correspondiéndose con estudios previos donde se usara axotomía/ICC (Wakisaka et al., 1991; 1992; Zhang et al., 1993a; Ma y Bisby, 1998a). El aumento tuvo relación directa con el grado de compresión del nervio, con valores progresivamente más altos de PNs NPY-IR inducidos a su vez por grados de compresión más severos. La CUNP ‘suave’ solo indujo un ligero aumento en el número de PNs NPY-IR. Esta observación está de acuerdo con trabajos previos usando el segmento C-terminal del NPY (CPON), un marcador de células productoras de NPY (Bergmark et al., 2001), o Gal (Dahlin et al., 2003), y que sugieren también una relación entre el grado de lesión del nervio y el incremento en la expresión de los mencionados marcadores.

El aumento progresivo de la expresión del NPY, observado principalmente en neuronas grandes y medianas, podría estar reflejando el grado diferencial de lesión de las fibras del nervio ciático. Mosconi y Kruger (1996), usando tubuladura de polietileno con diámetros internos progresivamente decrecientes para comprimir el nervio ciático, describieron que un grado mayor de compresión se correlaciona con un mayor número de fibras mielínicas degeneradas (A $\beta$ ), originadas por neuronas grandes de los GARDs (Willis y Coggeshall, 1991). Asimismo, Obata y cols. (2003) pudieron distinguir tres grupos entre ratas afectadas con ICC, basándose en el aumento del factor 3 activador de la transcripción (ATF-3). De este modo, definieron un grupo en el que ATF-3 aumentó

sólo en las neuronas grandes y algunas medianas, mientras que en otros dos grupos detectaron un incremento progresivo en el número de PNs ATF-3-IR, incluyendo también neuronas pequeñas. Los autores no indicaron el grado de compresión para cada uno de los grupos, pero relacionaron los cambios observados con el desarrollo de conducta dolorosa. Sería muy interesante saber si estos grupos presentan también diferencias en el grado de compresión del nervio.

Hay evidencia conductual (Pitcher et al., 1999) y morfológica (Mosconi y Kruger, 1996) que señala la gran afectación de fibras mielínicas durante la compresión crónica del nervio ciático como posible causal del mayor compromiso en la respuesta dolorosa al estímulo mecánico en comparación con el térmico en animales con dolor neuropático (Pitcher et al., 1999). También, pacientes con neuropatía periférica presentan una alteración más severa de la sensibilidad mecánica que térmica (Bouhassira et al., 1999; Sieweke et al., 1999). En este contexto, el aumento de NPY en neuronas grandes (productoras de fibras mielínicas) podría tener relevancia. De hecho, Ossipov y cols (2003) han observado que, en ratas con mononeuropatía en donde se detecta un aumento en el transporte de NPY desde los GARDs hacia el núcleo delgado del bulbo encefálico, el uso de antagonistas del RY1 a este nivel inhibe el dolor neuropático (Ossipov et al., 2002).

Por el contrario, en comparación con los claros efectos que las CUNPs y la ICC inducen en la expresión de NPY, estudios sobre CGRP luego de ICC han arrojado resultados contradictorios. Por un lado, se ha observado la disminución en el número de neuronas positivas de los GARDs, para el ARNm y el péptido (Nahin et al., 1994), con una disminución paralela en el asta dorsal lumbar (Bennett et al., 1989; Cameron et al., 1991; Xu et al., 1996a; Ma y Bisby, 1998b), mientras que otros reportes no describen ningún cambio evidente en los GARDs lumbares (Ma y Bisby, 1998b) o el asta dorsal



de la médula espinal (Garrison et al., 1993; Kajander y Xu, 1995; Munglani et al., 1995; Cameron et al., 1997).

Estudios previos han mostrado una fuerte disminución en la intensidad de expresión del mensajero para el RY1 en neuronas pequeñas de los GARD lumbares luego de la axotomía del nervio ciático de la rata (Zhang et al., 1994a; 1995d; Landry et al., 2000), pero con un incremento paralelo en el número de neuronas pequeñas expresando el ARNm del RY1 a bajos niveles, así como su aparición en algunas neuronas grandes (Zhang et al., 1994a; 1995d). Sin embargo, nuestros resultados muestran sólo una disminución en el número e intensidad de la inmunoreactividad de PNs RY1-positivos luego de la lesión periférica. Es posible que los cambios descritos para el ARNm del RY1 (Zhang et al., 1994a; 1995d) no se traduzcan en cambios a nivel proteico, o que la técnica de inmunohistoquímica usada en este estudio no sea lo suficientemente sensible para mostrar los probablemente sutiles cambios en los niveles de la proteína del RY1. De todos modos, el resultado final de estos cambios en neuronas de los GARDs implicaría una marcada reducción en la transmisión a través del RY1 (ver Abdulla y Smith, 1999a). Recordemos también que el RY2, que normalmente está presente en neuronas pequeñas de los GARDs, aumenta en PNs grandes y pequeños luego de la axotomía (Zhang et al., 1997).

### ***La axotomía y la CUNP ‘intensa’ induce cambios en el asta dorsal superficial***

En el asta dorsal de la médula espinal hemos observado un aumento en la expresión del NPY, particularmente en la región media de las láminas I-IV, confirmando lo indicado en varios estudios basados en la ICC (Munglani et al., 1995; Mark et al., 1998; Ma y Bisby, 1998a). También detectamos una disminución del RY1 en la parte más interna de la lámina II, especialmente después de axotomía y CUNP

'intensa'. No podemos precisar si esta disminución ocurre en neuronas locales del asta dorsal que expresan el RY1 (Zhang et al., 1994b; 1999) o se debe a la alteración de su transporte a través de las proyecciones centrales de las neuronas de los GARDs (ver Capítulo VI). Sin embargo, la axotomía del nervio ciático es capaz de inducir una disminución en la expresión del receptor para opioides de tipo  $\mu$  en la lámina II del asta dorsal, como consecuencia de un efecto transganglionar (Zhang et al., 1998a). Además, se ha descrito la disminución en la inmunoreactividad para GABA (Ibuki et al., 1997) así como de una de las enzimas sintetizadoras de GABA, la ácido glutámico decarboxilasa (GAD-65 pero no GAD-67) en el asta dorsal superficial luego de ICC del nervio ciático (Moore et al., 2002). Inclusive, se demostró degeneración transneuronal en las láminas superficiales del asta dorsal en ratas adultas luego de axotomía (Sugimoto et al., 1990; Azkue et al., 1998) o ICC (Sugimoto et al., 1990; Hama et al., 1996; Kawamura et al., 1997; Mao et al., 1997; Whiteside y Munglani, 2001; Moore et al., 2002). De este modo, es muy posible que un aumento en la actividad de las aferencias primarias y la reducción de la influencia inhibitoria local inducida por la injuria nerviosa periférica contribuya con el estado de excitación de las neuronas del asta dorsal y el consiguiente dolor. En este contexto, una disminución en la expresión del RY1 podría tener importancia.

Recientemente se ha descrito la localización presináptica del RY1 en varios sistemas neuronales (Pickel et al., 1998; St-Pierre et al., 2000; Ubink et al., 2001; Kopp et al., 2002), y existe evidencia de que el RY1 es transportado por los axones de las neuronas de los GARD (Brumovsky et al., 2002; ver Capítulo VI). También se ha observado que la lesión de un nervio periférico induce una significativa disminución del binding de [ $^{125}$ I]NPY en las láminas superficiales de la médula espinal lumbar, supuestamente como consecuencia de una disminución en el transporte del RY1 (Kar y

Quirion, 1992). Sin embargo, la disminución en la expresión del RY1 luego de axotomía y CUNP *'intensa'* parece reflejar cambios a nivel local, pudiendo tratarse de un efecto transganglionar. Si este efecto representa muerte neuronal o un proceso más fisiológico, como sería el caso de la internalización del receptor, se requiere mayor investigación.

### ***Significado funcional***

El sentido de los cambios inducidos por la lesión de un nervio periférico en la expresión del NPY y sus receptores en las neuronas de los GARDs y el asta dorsal de la médula espinal aún no está claro, como lo refleja la diversidad de reportes que le adjudican un rol analgésico, pronociceptivo o bifásico. El aumento en la expresión del NPY en neuronas de los GARDs luego de la lesión nerviosa periférica podría contrarrestar la generación de dolor, como lo indica el efecto inhibitorio del reflejo flexor nociceptivo que una inyección intratecal de altas dosis de NPY y también agonistas del RY1 posee en ratas normales y axotomizadas luego de un breve período de facilitación (Hua et al., 1991; Xu et al., 1994; Xu et al., 1999). Asimismo, la inyección de un agonista del RY2 en ratas axotomizadas deprime el reflejo flexor (Xu et al., 1999), posiblemente a través de la inhibición de corrientes de  $Ca^{2+}$  y la consecuente disminución de la secreción depolarización-dependiente de SP, como fuera mostrado en GARDs en cultivo de rata (Bleakman et al., 1988; Ewald, 1988; Walker et al., 1988), y mediante la técnica de la microsonda *in vivo* luego de la microinyección directa del NPY en la lámina II (Giuliani et al., 1989; Duggan et al., 1991). Es de destacar el posible rol que el RY1 tendría en la modulación del dolor a nivel de la sustancia gris periacueductal (Wang et al., 2000; 2001), o el núcleo delgado (Ossipov et al., 2002).

Por otra parte, se observó que ratones KO para el RY1 desarrollan una reducción marcada en el umbral de dolor mecánico (Naveilhan et al., 2001), sugiriendo un papel antinociceptivo tónico para este receptor. La alteración de la expresión del RY1 en el ratón KO es de algún modo similar a la que se observa con nuestro modelo. Sin embargo, en este ratón se suprimió al receptor de todos los sitios posibles de expresión, incluyendo las interneuronas del asta dorsal y presumiblemente neuronas de proyección (ver capítulo XI), y de los GARDs, con lo que se complica la determinación exacta de la injerencia del RY1 y el NPY en la modulación del dolor.

Contrario a lo expuesto hasta aquí, existe también evidencia del efecto pronociceptivo del NPY. White (1996) ha demostrado que la inyección intratecal prolongada del NPY o un agonista para el RY1, pero no de un agonista para el RY2, exagera la hiperalgesia inducida por lesión del nervio ciático (modelo de Seltzer), indicando un rol pronociceptivo para el RY1. Aún más, existe un incremento en la hiperalgesia periférica luego de la inyección subcutánea del NPY (Tracey et al., 1995), y un aumento del influjo RY1-dependiente de  $Ca^{2+}$  en neuronas sensoriales vagas que podría inducir liberación de neurotransmisores (Wiley et al., 1993).

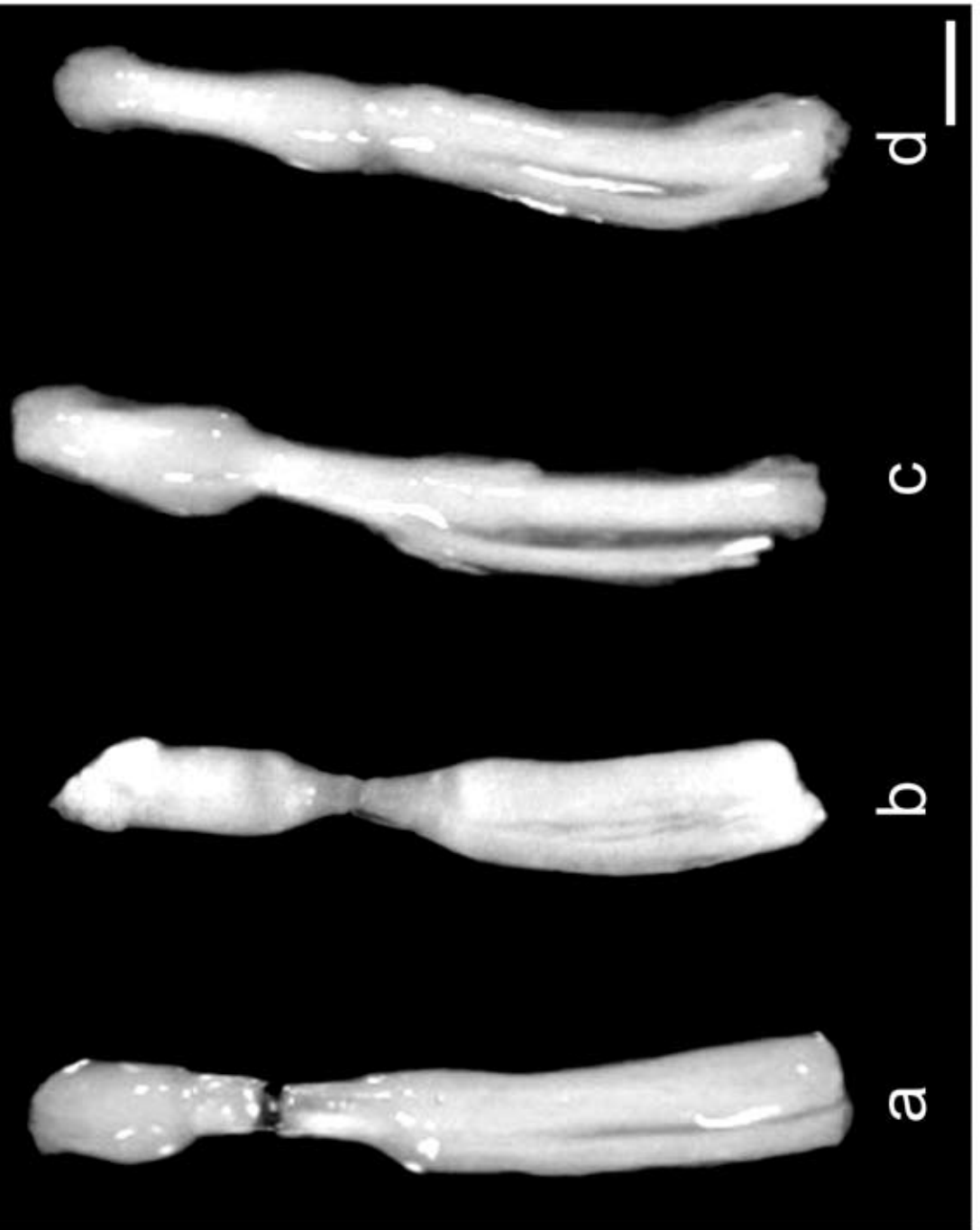
Así como se requieren mayores estudios para entender completamente la acción del NPY a nivel de la médula espinal, otra cuestión interesante es si el aumento del NPY en neuronas grandes de los GARD luego de la injuria periférica tiene su rol principal en el asta dorsal, o puede también modular la excitabilidad de los cuerpos neuronales dentro de los GARDs. La aplicación local del NPY en el cuerpo celular de neuronas aferentes primarias incrementa la excitabilidad de neuronas control de los GARDs vía RY2 (Abdulla y Smith, 1999a, b), posiblemente debido a la atenuación de la conductancia de canales de  $K^+$  sensibles al  $Ca^{2+}$ , a su vez secundaria a la supresión de la conductancia de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo N. Por el contrario, la unión al RY1 potencia

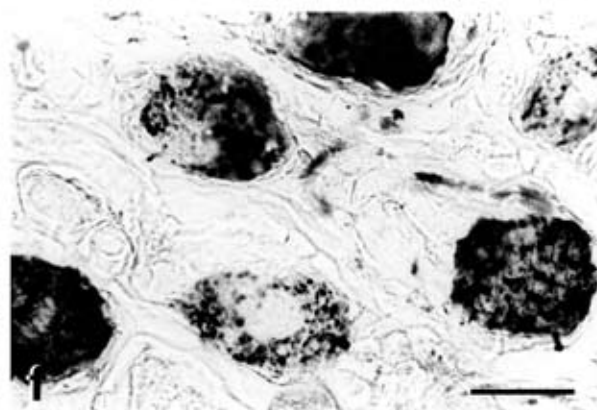
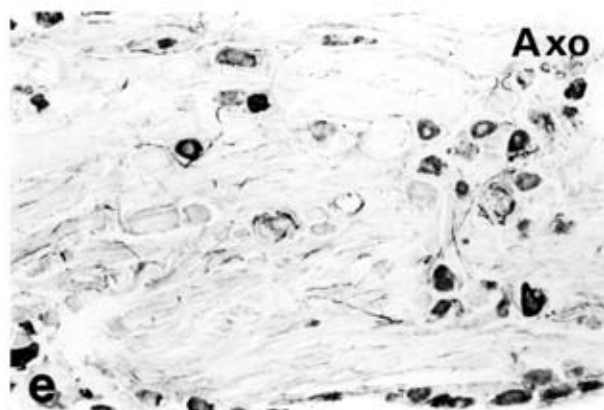
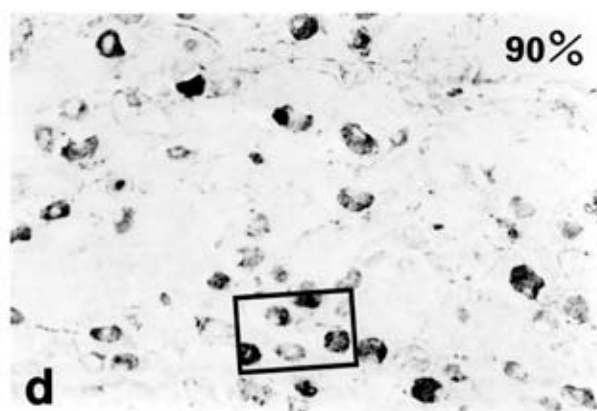
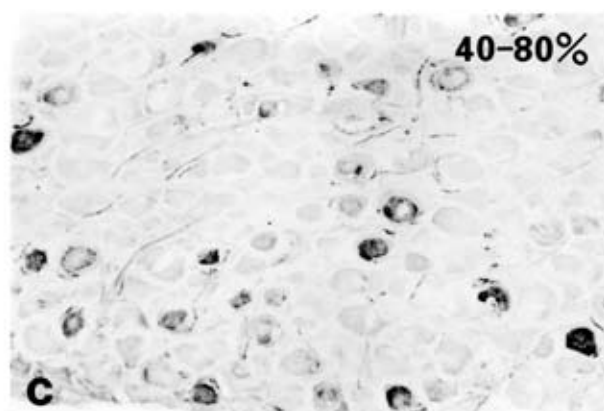
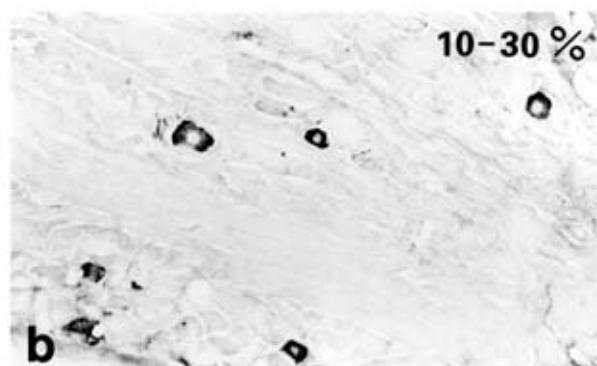
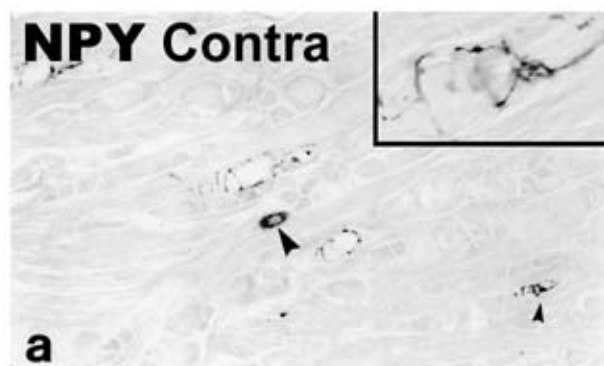
las corrientes a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, sin alterar la excitabilidad neuronal (Abdulla y Smith, 1999a, b). De acuerdo con estos resultados, se observó que luego de la axotomía (2 a 7 semanas), el efecto a través del RY2 aumenta y del RY1 se atenúa (Abdulla y Smith, 1999a, b), correspondiéndose con el aumento de la expresión del RY2 luego de axotomía (Zhang et al., 1997) y la paralela disminución del RY1 (Zhang et al., 1994a; 1995d). Inclusive, la población de neuronas grandes de los GARDs se hace más excitable en ratas axotomizadas que desarrollan autotomía respecto de aquellas en las que no se observa tal conducta (Abdulla y Smith, 2001a, b). Así, es posible que el intenso aumento en la expresión del NPY (Wakisaka et al., 1991; 1992; Ma y Bisby, 1998a) y del RY2 (Zhang et al., 1997) favorezca los cambios observados en la excitabilidad de las neuronas grandes de los GARDs por activación de autoreceptores somáticos y/o heteroceptores RY2, como fuera sugerido por Mantyh y cols. (1994). Apoyando esta hipótesis, Mark y cols. (1998) han mostrado la secreción espontánea de NPY en el asta dorsal luego de axotomía, y esto podría quizás también ocurrir a nivel de los cuerpos celulares. De hecho, la secreción de péptidos desde neuronas presentes en los GARDs (SP; Huang y Neher, 1996) y trigeminal (CGRP; Ulrich-Lai et al., 2001) ha sido demostrada, así como la secreción de CGRP por estimulación térmica nociva desde preparaciones en cultivo de nervios ciáticos de rata (Sauer et al., 2001). Asimismo, se ha descrito la excitación químicamente mediada entre neuronas de los GARDs (Devor y Wall, 1990; Utschneider et al., 1994; Amir y Devor, 1996), afectando probablemente a neuronas productoras de fibras tipo A $\beta$  (Devor y Wall, 1990).

### **Conclusiones**

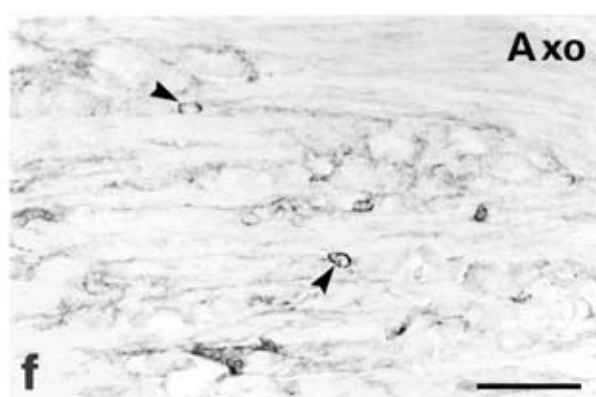
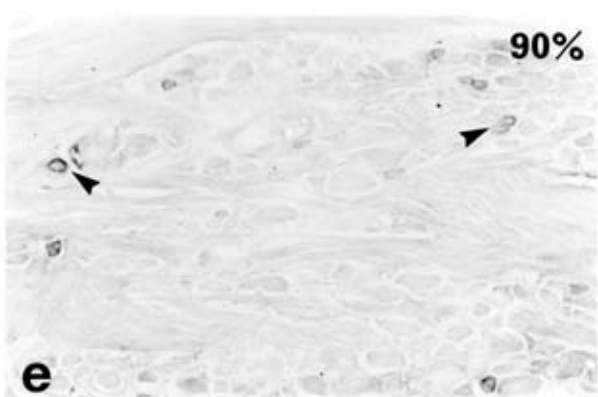
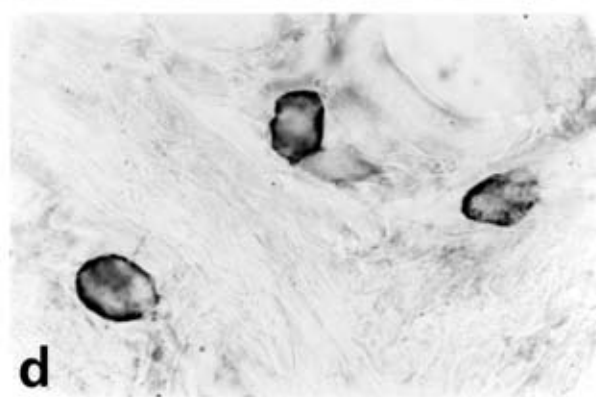
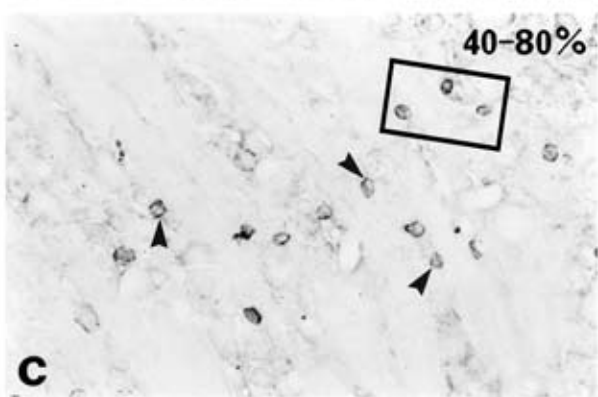
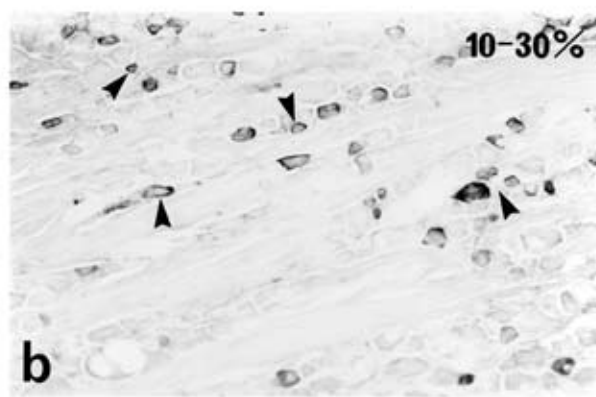
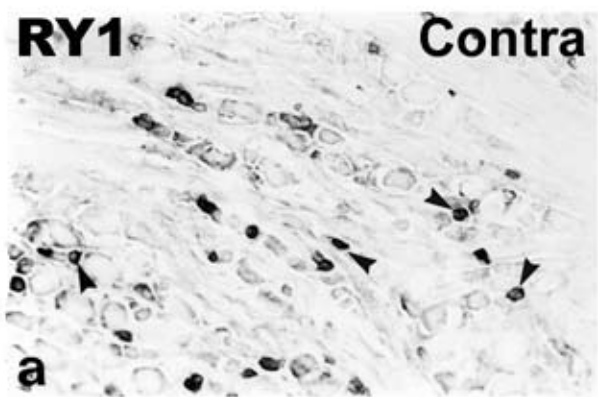
Varios estudios previos han comparado los cambios en la expresión peptidérgica de las neuronas aferentes primarias (Marchand et al., 1994; Nahin et al., 1994) y la médula espinal (Garrison et al., 1993; Munglani et al., 1995; 1996; Cameron et al., 1997) con la generación de dolor luego de la compresión del nervio ciático. Un análisis similar fue llevado a cabo para el ganglio trigeminal y la compresión del nervio infraorbitario (Benoliel et al., 2001). Con este trabajo, demostramos que CUNPs de intensidad graduada del nervio ciático de la rata causan cambios de diferente magnitud en la expresión del NPY y el RY1 en las neuronas de los GARDs. Es más, la conducta dolorosa también fue dependiente del grado de compresión del nervio, siendo la CUNP ‘*media*’ la más efectiva para inducir alodinia mecánica. Los cambios químicos y conductuales fueron similares a los obtenidos con el modelo de Bennett en ratas, aunque el efecto en la expresión del RY1 nunca antes fue reportado.

Nuestros resultados también sugieren que algunas de las diferencias observadas en varios estudios usando el modelo de Bennett en cuanto al desarrollo de conducta dolorosa podrían deberse a diferentes grados de compresión, como ya lo discutieran otros (Mosconi y Kruger, 1996; Pitcher et al., 1999). Sin embargo, la relación entre las lesiones de un nervio periférico, los cambios geno- y fenotípicos generados en neuronas aferentes primarias y la manifestación de dolor deben ser analizados con cautela. Así, un intenso dolor sin cambios importantes en el número de fibras grandes mielínicas (Britland et al., 1990) o hipoalgesia derivada de la pérdida intensa de fibras mielínicas (Kakigi et al., 1991; Chan et al., 1992) han sido demostrados en distintos grupos de pacientes diabéticos con neuropatía periférica.

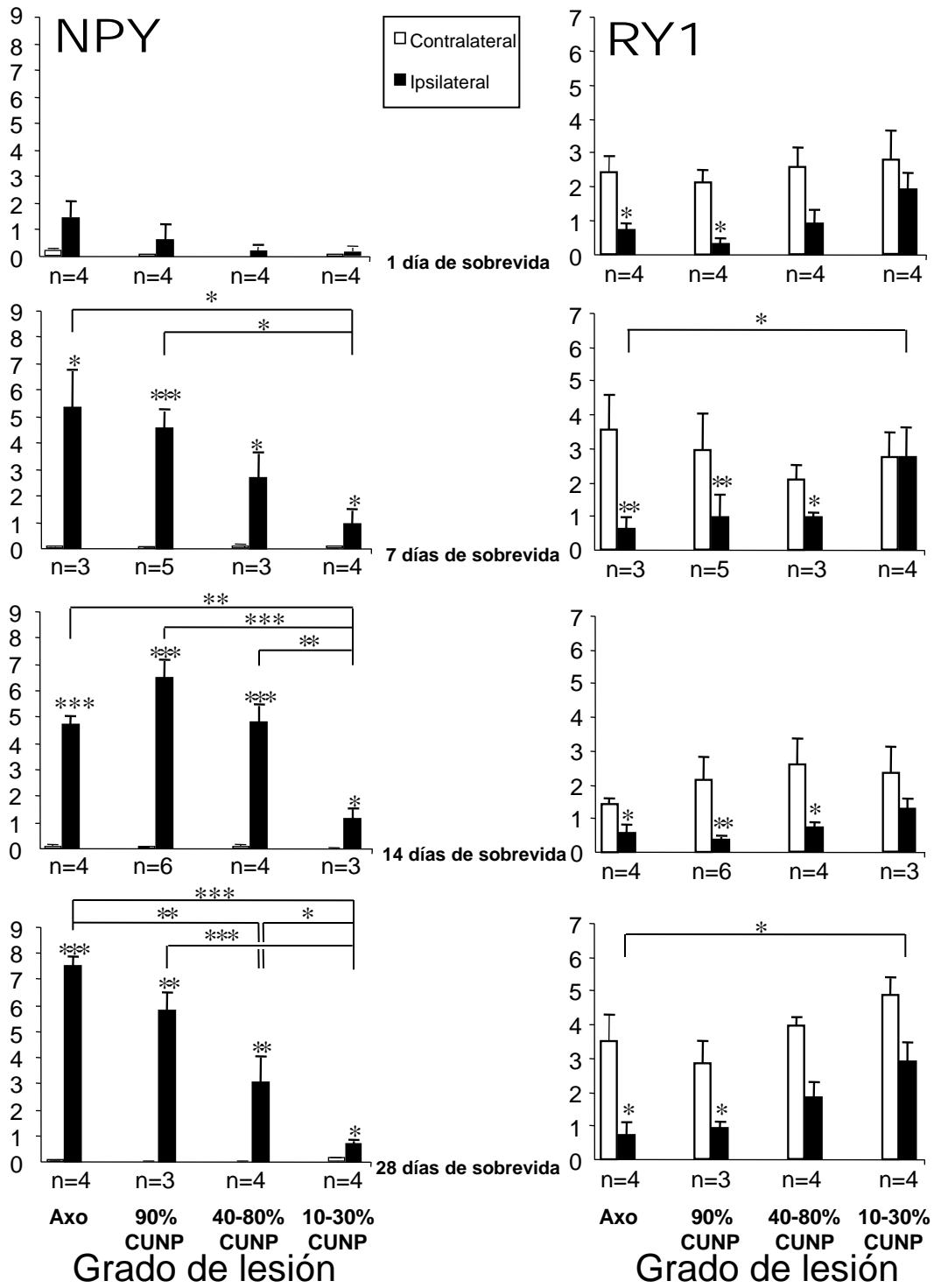






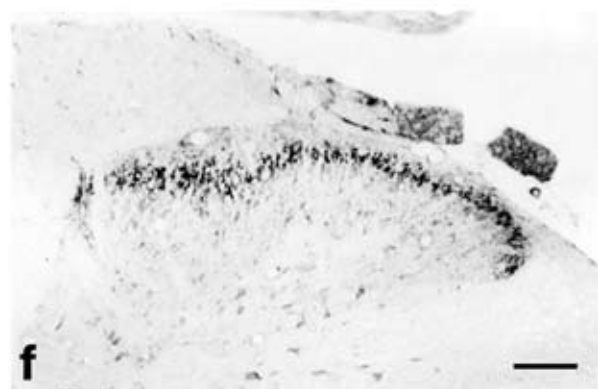
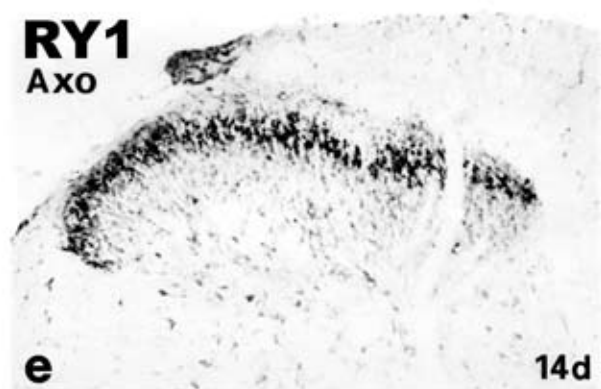
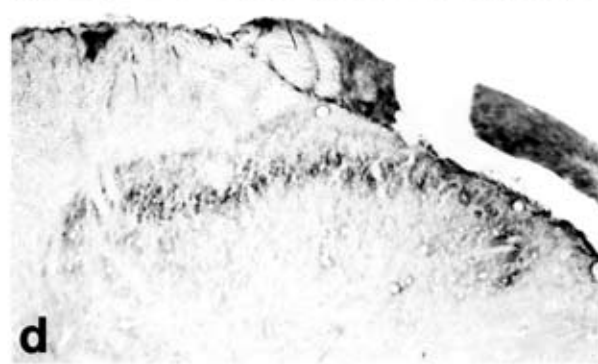
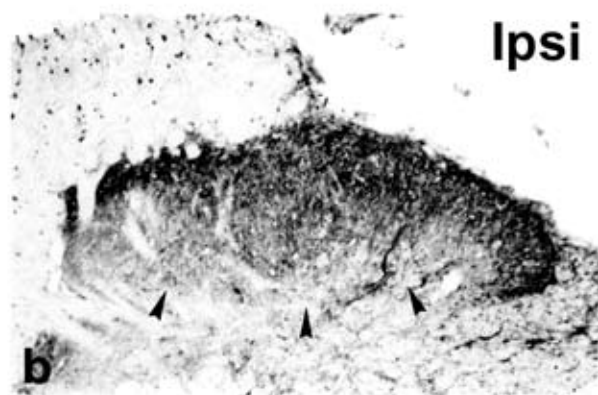


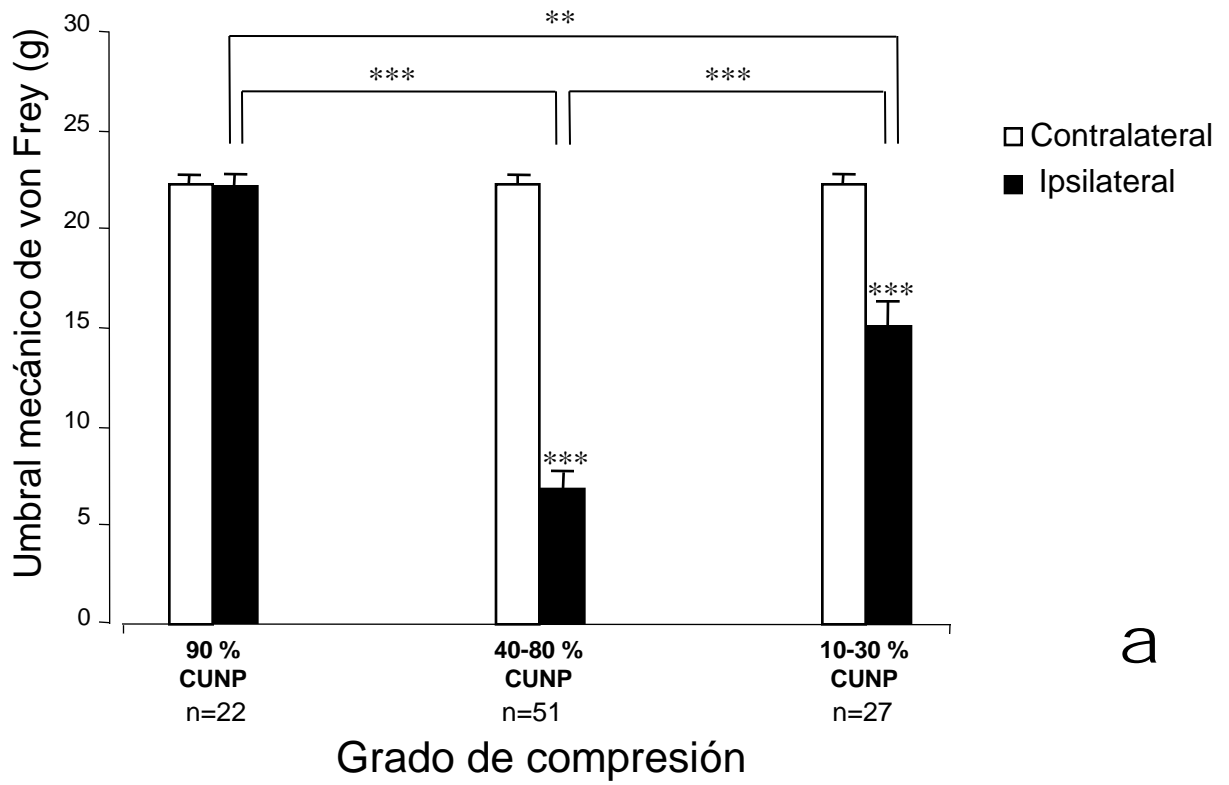
Número de perfiles neuronales inmunoreactivos/100,000 micrómetros de área



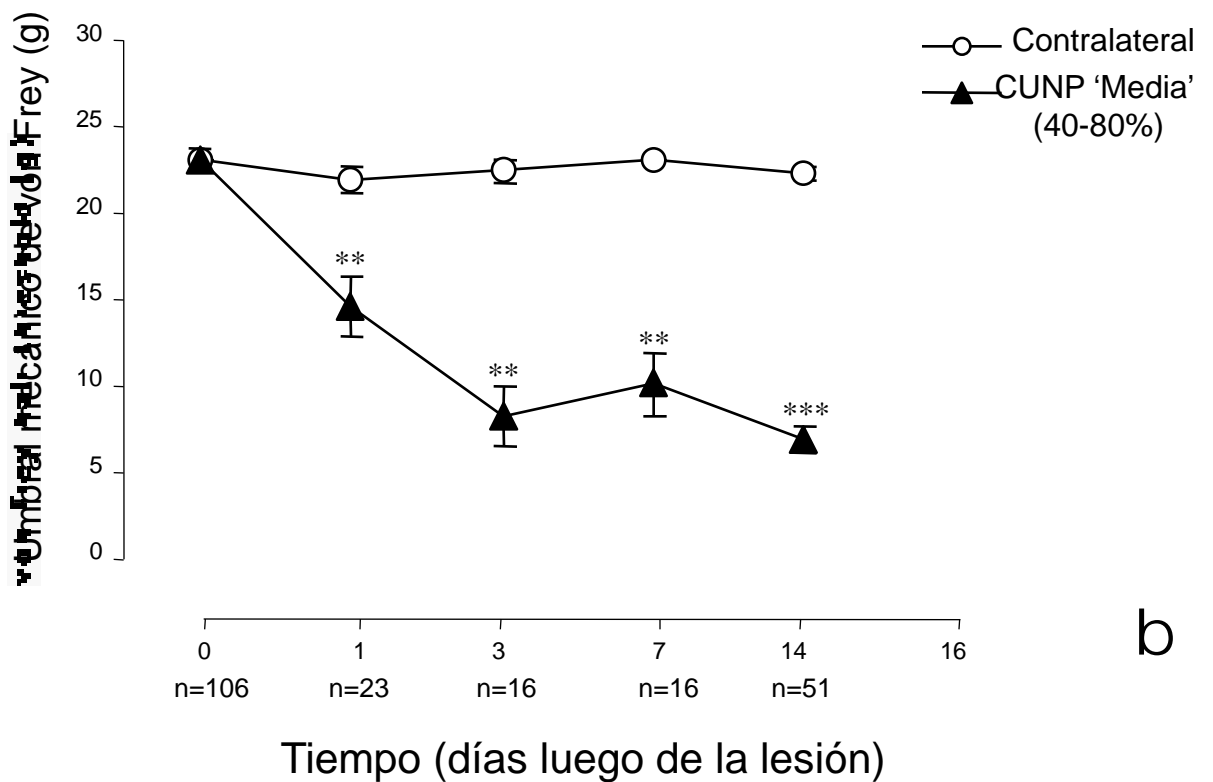
a

b





a



b

**Acciones pronociceptiva y analgésica  
receptor-específicas de Galanina en la  
médula espinal: Acciones selectivas vía  
receptores GalR1 y GalR2**

## Introducción

Gal es un neuropéptido de 29 aminoácidos (30 en el hombre) (Tatemoto et al., 1983). Se encuentra distribuido ampliamente en el sistema nervioso e involucrado en una gran variedad de actividades fisiológicas y patofisiológicas (Hökfelt et al., 1998a), entre las que se incluyen la transmisión del dolor (Wiesenfeld-Hallin et al., 1992a; Xu et al., 2000b; Wynick et al., 2001). Los niveles de Gal en neuronas de los GARDs son normalmente muy bajos, tanto para su mensajero como para la misma proteína (Hökfelt et al., 1987; Villar et al., 1989). Su expresión aumenta notablemente en varios modelos animales de lesión nerviosa periférica, incluyendo la axotomía completa (Hökfelt et al., 1987; Villar et al., 1989), la compresión crónica (Nahin et al., 1994; Ma y Bisby, 1997; Shi et al., 1999), o la ligadura parcial (Ma y Bisby, 1997; Shi et al., 1999). Como consecuencia, se produce un incremento en la secreción de galanina en el asta dorsal superficial ipsilateral (Colvin et al., 1997).

Como se dijera más arriba, Gal se hallaría involucrada en procesos de dolor crónico, aunque su rol parece ser complejo. Algunos de los primeros trabajos le adjudicaron funciones inhibitorias (Yanagisawa et al., 1986; Cridland y Henry, 1988; Post et al., 1988; Wiesenfeld-Hallin et al., 1988), y a dosis bajas acción excitatoria (Wiesenfeld-Hallin et al., 1989a, b; Kuraishi et al., 1991), aunque con una aumentada capacidad inhibitoria luego de la lesión de un nervio (Wiesenfeld-Hallin et al., 1989b; 1992b). Por otro lado, se ha descrito que la galanina, luego de la injuria neural, podría contribuir a la generación del dolor neuropático (Ma y Bisby, 1997). De hecho, la infusión de dosis bajas de galanina resulta en la disminución del umbral de dolor (Kerr et al., 2000; Reeve et al., 2000).

Hasta el momento, se han identificado y clonado tres receptores para galanina (Habert-Ortoli et al., 1994; Burgevin et al., 1995; Parker et al., 1995; Fathi et al., 1997; Howard et al., 1997; Smith et al., 1997; Wang et al., 1997a; Wang et al., 1997b; Ahmad et al., 1998; Bloomquist et al., 1998; Kolakowski et al., 1998; Smith et al., 1998; Branchek et al., 2000). Además, el ARNm para los tres tipos de receptor se expresa en los GARDs y la médula espinal con diferentes patrones de distribución, intensidad y respuesta a la injuria de un nervio periférico (Xu et al., 1996b; Shi et al., 1997; Zhang et al., 1998b; O'Donnell et al., 1999; Branchek et al., 2000; Xu et al., 2000b). Los receptores galaninérgicos pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a la proteína G, y usan diferentes vías de transducción intracelular (Branchek et al., 2000). Así, los receptores RGal1 y -2, probablemente los más relevantes en las funciones de Gal en el dolor crónico, se expresan en neuronas de los GARDs (O'Donnell et al., 1999; Waters y Krause, 2000), y en la médula espinal en las láminas I y II principalmente (O'Donnell et al., 1999). El RGal3, sin embargo, posee bajos niveles de expresión en los GARDs y la médula espinal (Iisma y Shine, 1999; Branchek et al., 2000; Waters y Krause, 2000). Esta multitud de receptores podría explicar la diversa y aparentemente opuesta gama de roles que Gal tendría en el procesamiento del dolor a nivel espinal.

Por un largo tiempo, la carencia de drogas específicas y eficientes que influyeran los mecanismos galaninérgicos a través de sus receptores constituyó un escollo importante para el entendimiento de las acciones de Gal. Sin embargo, Bartfai y cols. (1992) desarrollaron una serie de análogos peptidérgicos con actividad de antagonista sobre los receptores de galanina. También, se crearon dos antagonistas no-peptidérgicos pequeños para RGal1 mediante búsqueda random (Burrier et al., 1997; Scott et al., 2000). Schmidt y cols. (1999) sintetizaron el péptido análogo AR-M961, [Sar(1), D-

Ala<sup>12</sup>Gal(1-16)-NH<sub>2</sub>, con una gran afinidad y actividad funcional para RGal1 y -2. En el presente estudio, describimos el desarrollo de un nuevo agonista, el AR-M1896 [Gal(2-11)Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-NH<sub>2</sub>], con una acción de agonista selectivo para RGal2. También, hemos comparado los efectos del AR-M961 y el AR-M1896 en la conducta dolorosa aparecida luego de su inyección aguda e i.t. bajo diferentes condiciones para explorar los mecanismos subyacentes a los variados roles que la galanina tiene en el procesado del dolor a nivel espinal.

## **Materiales y Métodos**

### **Caracterización de un ligando de receptores de Galanina**

Los ensayos funcionales y de binding fueron realizados exactamente como fuera descrito previamente (Carpenter et al., 1999). Brevemente, los ensayos de binding del receptor midieron la potencia de la galanina humana (h) iodada 125 (0.04 nM) en membranas de células HEK293S expresando RGal2 de rata (r) y en células de melanoma de Bowes expresando el RGal1 (h). Estos ensayos fueron realizados en una solución Tris 50mM/ MgCl<sub>2</sub> 3 mM/ BSA 2.5 mg/ml/ β-endorfina 3.75 μM, con un pH de 7.4, y fueron terminados a equilibrio por filtración. El ensayo funcional para el RGal1 (h) midió la potencia de los compuestos testeados (hGal; AR-M961; AR-M1896; AR-M1717), de estimular el binding de guanosina 5'-[γ-thio]trifosfato a membranas de células de melanoma de Bowes en una solución de Hepes 50 mM/ NaOH 20 mM, a un pH de 7.4/ MgCl<sub>2</sub> 5 mM/ NaCl 100 mM/ EDTA 1 mM/ BSA 0.1%/ GDP 15 μM. El ensayo funcional para el RGal2 midió la potencia de los compuestos testeados, de estimular la movilización del calcio intracelular en células HEK293S con RGal2 cargadas con Fluo-3. Estos experimentos se realizaron mediante el uso de un lector de



placas con imágenes fluorescentes (Molecular Devices) en un buffer de Hank suplementado con Hepes 20 mM más BSA al 0.1%, pH 7.4.

### **Efectos de agonistas galaninérgicos en la conducta dolorosa**

#### **Animales**

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (240-260 g) (B & K Universal, Sollentuna, Suecia). Las mismas fueron mantenidas en jaulas a temperatura ambiente (20-25 °C) en un ciclo día/noche de 12 horas cada uno, con acceso libre a comida y agua. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Guía Ética para la Investigación y Experimentación de Dolor en Animales Conscientes (Zimmermann, 1983) y fueron aprobados por el comité de ética local para investigaciones animales.

***Injuria unilateral del nervio ciático (ICC).*** Esta se produjo bajo la acción de pentobarbital sódico i.p. (Mebumal, 60 mg/Kg) el cual induce una profunda anestesia. Como fuera descrito por Bennett y Xie (1988), el nervio ciático común fue expuesto en una extensión aproximada de 10 mm a nivel de la parte media del muslo de la rata. Se practicaron 4 ligaduras suaves alrededor del nervio (Ethicon, 4.0 plain gut), distanciadas 1 mm una de la otra, y se cerró la incisión cutánea por medio de una sutura.

***Cateterización intratecal.*** Un catéter intratecal (PE 10, diámetro externo 0.61 mm) fue implantado entre las vértebras L5-6 bajo anestesia (Storkson et al., 1996) en ratas naïve o con 7 días de ICC, con el tip ubicado en la zona de ensanchamiento lumbar. La implantación fue controlada en las 24 hs previas a los experimentos farmacológicos, mediante la evaluación del bloqueo sensorial y motor inducido por la inyección intratecal de 7 µl de lidocaína (50 mg/ml, AstraZeneca R & D, Montreal).

**Implantación de minibombas osmóticas.** Veinte y nueve ratas normales con un catéter i.t. implantado (5 días antes) recibieron una dosis baja de galanina o uno de los agonistas en forma continua durante 14 días. Para ello, se implantaron en el tejido celular subcutáneo bombas minosmóticas (Alzet, modelo 2002, 0.5  $\mu$ l/h) llenas de vehículo [1 mg de albúmina de suero de rata (Sigma), 1 mg de ampicilina (Pentrexyl; Bristol-Myers Squibb)] en 1 ml de ClNa al 0.9% estéril, galanina (50  $\mu$ g/ml de vehículo, Bachem) o un agonista (AR-M1896, 19.8  $\mu$ g o AR-M961, 28.4  $\mu$ g/ml de vehículo) a concentraciones equimolares (15.8  $\mu$ M) las cuales fueron conectadas con el catéter intratecal. Las soluciones mencionadas fueron administradas a una velocidad constante (25 ng de galanina/h, 9.88 ng de AR-M1896/h, 14,2 ng de AR-M961/h; correspondiendo a 7.9 pmol/h). Todos los péptidos fueron reconstituídos en agua destilada, diluídos con solución salina estéril y fueron guardados en alícuotas a -20 °C hasta su utilización. La localización del tip de los catéteres se examinó con lidocaína antes de sacrificar a los animales, y se utilizaron los valores obtenidos del lado con mayor bloqueo sensorial. El umbral de dolor mecánico y la sensibilidad al frío fueron medidos 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 13 días luego de la implantación.

### **Tests de Conducta**

Todos los tests de conducta fueron practicados durante el día (9.00-18.00). Las ratas fueron ubicadas en domos de plástico transparente (8 x 8 x 18 cm) sobre una malla metálica con orificios de 3 x 3 cm, permitiéndoseles 15 minutos de adaptación previo al inicio de los tests.

**Test de von Frey.** Se aplicó una serie de filamentos de von Frey (0.5, 0.88, 1.28, 2.7, 5.1, 7.5, 8.8, 13.5, y 23 g) (con 23 g tomado como límite) en forma ascendente desde abajo hacia el centro de la superficie plantar de la pata posterior ipsilateral de ratas con

ICC y en ambas patas de ratas normales implantadas con las bombas Alzet. Cada filamento se aplicó tres veces con intervalos de  $\approx 2$  segundos. La menor fuerza a la que cada una de las tres aplicaciones del filamento indujera una retirada brusca de la pata fue tomada como el umbral de respuesta mecánica.

**Sensibilidad al frío.** La misma se midió utilizando el método de Choi y cols. (1994). Así, se formó una burbuja de acetona en el tip de una cánula conectada a una jeringa de 2 ml, y fue aplicada muy delicadamente a la parte central de la superficie plantar de la pata de la rata, con la distribución inmediata de la acetona por la parte central de la pata. Se procedió del mismo modo cinco veces (una cada 5 minutos) por cada pata. La retirada brusca de la pata fue considerada positiva para el test y asignada con el número 1, mientras que a la ausencia de tal signo se le asignó el valor 0, como una respuesta negativa. Un rango total de 0 a 5 fue tomado como indicador de la sensibilidad al frío.

### **Diseño experimental**

En todos los casos, los tests de conducta fueron realizados en ciego. Se dividió a las veinte y nueve ratas normales en 4 grupos al azar (7 u 8 ratas por grupo). En cada grupo se aplicó una dosis baja y constante de un agonista galaninérgico por vía i.t. a través de las bombas miniosmóticas. Asimismo, se practicó la infusión de vehículo y dosis bajas de galanina como control negativo y positivo, respectivamente.

Por su parte, en las ratas con ICC, se midió el umbral mecánico a los 14 días luego de la injuria nerviosa. El rango del umbral del dolor estuvo normalmente entre 2.85 y 23 g. Así, se dividió a las ratas en dos grupos de acuerdo al umbral que presentaran, en no-alodínicas ( $\geq 23$  g) y alodínicas ( $\leq 5.1$  g). En los grupos así formados se aplicaron dosis i.t. altas de cada agonista. Como control se usaron inyecciones de un

mismo volúmen (10  $\mu$ l) de solución salina. En el primer experimento, se administró por vía i.t. una dosis muy alta (20  $\mu$ g) de un agonista galaninérgico o del vehículo a seis ratas alodínicas y tres no-alodínicas, con la posterior medición del dolor en ciego. Luego, empleamos dosis más bajas (1  $\mu$ g y 9  $\mu$ g) de AR-M961 para evaluar la dosis-dependencia del efecto antialodínico de este agonista de RGal1 y -2 en ratas con alodinia pero sin la condición del experimento en ciego (resultados no mostrados). Para confirmar los efectos de los dos agonistas en ratas alodínicas y no-alodínicas, practicamos una segunda serie de experimentos en ciego haciendo inyecciones alternadas en siete ratas alodínicas y cinco no-alodínicas, usando un régimen con incremento progresivo de las dosis (0.1, 1 y 10  $\mu$ g).

### **Estadística**

Los resultados fueron presentados como la media  $\pm$  desviación absoluta derivada de la media. Se utilizó el test de Friedman ANOVA para analizar la información en cada grupo en el curso del tiempo. Además, se usó el test de Kruskal-Wallis ANOVA para la comparación de los resultados entre grupos a una sobrevida determinada. Se eligió un valor de *P* menor de 0.05 como indicador de significancia.

### **Resultados**

#### ***Características del agonista para RGal2, AR-M1896***

El análisis de la actividad de la estructura de Gal reveló que el segmento C-terminal truncado de Gal(1-11)-NH<sub>2</sub> es el ligando no-selectivo de alta afinidad más corto para los RGal1 y -2 (Tabla VI.1). A pesar que este análogo se une con gran afinidad al RGal1, su actividad funcional es extremadamente baja con un EC<sub>50</sub> de sólo 4.4  $\mu$ M. Así, la remoción adicional de una glycina residual en la posición 1 resultó en la

creación de Gal(2-11)-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-NH<sub>2</sub> (AR-M1896) con una casi inmodificada afinidad por RGal2, actividad funcional conservada y una selectividad por RGal2 500 veces mayor que por RGal1. Se constituye así en un verdadero análogo galaninérgico selectivo para RGal2, convirtiéndose en una herramienta farmacológica excepcional para el estudio de la acción diferencial de los dos receptores.

***Efectos proalodínicos de dosis bajas de agonistas galaninérgicos en ratas normales***

Se observó la reducción del umbral de dolor por estímulo mecánico (Fig. VI.1a) con un paralelo aumento de la sensibilidad al frío por acetona (Fig. VI.1b) en la pata posterior de las ratas que recibieron una infusión i.t. de galanina (25 ng per 0.5 µl/h), AR-M1896 (9.88 ng per 0.5 µl/h), o AR-M961 (14.2 ng per 0.5 µl/h) ( $P < 0.01$ ). Asimismo, la infusión de vehículo no indujo ningún cambio significativo en el umbral de dolor obtenido con los filamentos de von Frey o la acetona ( $P > 0.05$ ) (Fig. VI.1). De este modo, el umbral de alodinia mecánica disminuyó en los tres grupos de tratamiento respecto del grupo control a los 2 días luego de la infusión i.t. ( $P < 0.01$ ) (Fig. VI.1a). Por su parte, la sensibilidad al frío se incrementó luego de 2 días de infusión de galanina ( $P < 0.05$ ) y luego de 4 días de la infusión con AR-M1896 o AR-M961 ( $P < 0.05$ ) (Fig. VI.1b).

***Efecto antialodínico del AR-M961 en el modelo de dolor neuropático de Bennett***

En ratas alodínicas, el umbral mecánico aumentó en forma dosis-dependiente luego de la inyección del AR-M961 ( $P < 0.001$ ). Este umbral fue significativamente mayor que el observado para el grupo control 7.5 y 15 min luego de la inyección de 1 µg ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente), 7.5, 15 y 30 min luego de la inyección de 10

$\mu\text{g}$  ( $P < 0.01$  para todos), y 15 y 30 min luego de la inyección de 20  $\mu\text{g}$  ( $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ , respectivamente) de AR-M961. Por el contrario, no se detectaron cambios en los grupos control y tratados con AR-M1896 ( $P > 0.05$ ) (Fig. VI.2a).

En ratas no alodínicas, ninguno de los agonistas galaninérgicos o el vehículo indujeron un cambio significativo en el umbral mecánico de la pata posterior ( $P > 0.05$ ) (Fig. VI.2b).

**Tabla VI.1.** Caracterización de la capacidad de unión y actividad funcional de análogos de galanina.

**Tabla VI.1.** Characterization of binding and functional activity of galanin analogs.

**Fig. VI.1.** Efectos de la infusión de dosis bajas de agonistas galaninérgicos por vía i.t. en la sensibilidad mecánica (A) y al frío (B) en la pata posterior de ratas normales. La sensibilidad mecánica y al frío aumentaron significativamente luego de la infusión i.t. de cada agonista (Friedman ANOVA,  $P < 0.05$ ), mientras que la infusión de vehículo no indujo ningún cambio significativo en el umbral de von Frey o la sensibilidad al frío (Friedman ANOVA,  $P > 0.05$ ). Dos días después de la infusión i.t., el umbral estudiado con los filamentos de von Frey fue más bajo en los tres grupos de tratamiento que en el grupo control (Kruskal-Wallis ANOVA,  $P < 0.01$ ). El rango de frío se incrementó luego de dos días de la infusión de galanina ( $P < 0.05$ ) y 4 días después de la infusión de AR-M1896 o AR-M961 ( $P < 0.05$ ). \* y \*\* (grupo galanina), # y ## (grupo AR-M1896), y § y §§ (grupo AR-M961) indican  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente, comparando con el grupo vehículo a un mismo tiempo de infusión (Kruskal-Wallis ANOVA).

**Fig. VI.1.** Effects of intrathecal (i.t.) infusion of low-dose galanin agonists on the mechanical (A) and cold (B) sensitivity of the hindpaw in normal rats. Both mechanical and cold sensitivity of the hindpaw increased significantly after i.t. infusion of either agonist (Friedman ANOVA,  $P < 0.05$ ), whereas infusion of vehicle did not induce any significant change of von Frey hair threshold or cold score (Friedman ANOVA,  $P > 0.05$ ). At 2 days after i.t. infusion, the von Frey hair threshold was lower in the three treatment groups than in the control group (Kruskal-Wallis ANOVA,  $P < 0.01$ ). The cold score increased 2 days after infusion of galanin ( $P < 0.05$ ) and 4 days after infusion of AR-M1896 or AR-M961 ( $P < 0.05$ ). \* and \*\* (galanin group), # and ## (AR-M1896), and § and §§ (AR-M961 group) indicate  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively, compared with vehicle group at the same time point (one-way ANOVA on ranks).



**Fig. VI.2.** Efecto de los agonistas galaninérgicos (AR-M1896 y AR-M961) sobre el umbral de sensibilidad mecánica en ratas alodínicas (A) y no-alodínicas (B) afectadas con el modelo de Bennett. En ratas alodínicas, los umbrales para la sensibilidad mecánica se incrementaron en un modo dosis-dependiente luego de la inyección i.t. de AR-M961 (mediciones repetidas ANOVA en rangos,  $P < 0.001$ ). El umbral fue significativamente mayor que en las ratas control a los 7.5 y 15 minutos luego de la inyección de 1  $\mu\text{g}$  (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente) a los 7.5, 15 y 30 min luego de la inyección de 10  $\mu\text{g}$  ( $P < 0.01$  para todos), y a los 15 y 30 min luego de la inyección de 20  $\mu\text{g}$  ( $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ , respectivamente) de AR-M961. No se observaron cambios en ratas de los grupos control y AR-M1896 (mediciones repetidas ANOVA en rangos,  $P > 0.05$ ). En ratas no-alodínicas, ninguno de los agonistas galaninérgicos ni el vehículo indujo un cambio significativo en el umbral de sensibilidad mecánica de la pata posterior (mediciones repetidas ANOVA en rangos,  $P > 0.05$ ), \* y \*\* indican  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente, comparando con el grupo control a un mismo tiempo de testeo (ANOVA de una vía en rangos).

**Fig. VI.2.** Effects of galanin agonists (AR-M1896 and AR-M961) on the mechanical threshold in allodynic (A) and nonallodynic (B) Bennett model rats. In allodynic rats, the mechanical threshold dose-dependently increased after i.t. injection of AR-M961 (repeated measures ANOVA on ranks,  $P < 0.001$ ). The threshold was significantly higher than control group at 7.5 and 15 min after injection of 1  $\mu\text{g}$  (one-way ANOVA on ranks,  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively) at 7.5, 15, and 30 min after injection of 10  $\mu\text{g}$  ( $P < 0.01$  for all), and at 15 and 30 min after injection of 20  $\mu\text{g}$  ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively) of AR-M961. No change was observed in control and AR-1896 groups (repeated measures ANOVA on ranks,  $P > 0.05$ ). In nonallodynic rats, neither galanin agonists nor vehicle induced any significant change of the mechanical threshold of the hindpaw (repeated measures ANOVA on ranks,  $P > 0.05$ ). \* and \*\* indicate  $P > 0.05$  and  $P > 0.01$ , respectively, compared with control at the same time point (one-way ANOVA on ranks).

## Discusión

Mediante el presente trabajo, presentamos un análogo de galanina, el AR-M1896 [Gal(2-11)-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-NH<sub>2</sub>], cuya alta selectividad por el RGal2 lo hace especialmente ideal para el estudio de las acciones de Gal sobre diferentes subtipos de receptor. Así, en combinación con galanina y el previamente publicado análogo AR-M961, [Sar(1), D-Ala12]Gal(1-16)-NH<sub>2</sub>, el cual se une con similar afinidad a los receptores RGal1 y -2, fue posible abordar la tarea de diferenciar los roles de estos dos receptores en la conducta dolorosa. Estos dos compuestos o galanina fueron aplicados por la vía i.t. en ratas normales o afectadas por ICC, el modelo de dolor neuropático desarrollado por Bennett y Xie (Bennett y Xie, 1988). Nuestros resultados pueden al menos en parte explicar la variedad de respuestas conductuales y electrofisiológicas reportadas en la literatura para Gal, así como esclarecer el controversial rol que Gal exhibe en el procesado de dolor. Inclusive, nos permite sugerir que la presencia, expresión diferencial, y los niveles de expresión de los tres receptores galaninérgicos RGal1, -2 y -3 en los GARDs y la médula espinal (Parker et al., 1995; Gustafson et al., 1996; Xu et al., 1996b; Shi et al., 1997; Smith et al., 1998; O'Donnell et al., 1999; Branchek et al., 2000; Waters y Krause, 2000) constituyen factores importantes para ser considerados en el análisis de las funciones de Gal. Así, el RGal1 parecería ser responsable de la inhibición del dolor luego de injuria nerviosa periférica, mientras que el RGal2 mediaría los efectos excitatorios de galanina en dosis bajas en ratas normales.

Ya previamente se recurrió a la aplicación de Gal exógena en la médula espinal. Una dosis i.t. baja y única de galanina (0.1 y 1 nmol) incrementó la excitabilidad del reflejo de retirada en ratas normales (Kuraishi et al., 1991) del mismo modo que en ratas descerebradas, espinalizadas o anestesiadas (Wiesenfeld-Hallin et al., 1988; 1989a). De

hecho, la Gal aumentó de un modo dosis-dependiente la respuesta evocada, la postdescarga y el “wind-up” de fibras de tipo C y A $\delta$ , demostrando una acción pronociceptiva (Reeve et al., 2000). Más aún, la aplicación i.t. crónica de dosis bajas de galanina exógena (25 ng/h, 14 días) en ratas adultas no-lesionadas, al crear condiciones supuestamente similares a las de una secreción aumentada de galanina por injuria neural, indujo hipersensibilidad mecánica persistente. Finalmente, Kerr y cols. (Kerr et al., 2000) encontraron que luego de la axotomía o la injuria parcial del nervio ciático, la conducta de dolor neuropático espontánea y evocada era eliminada o severamente comprometida en ratones knock-out (KO) para Gal. Esto, sumado a otros reportes (Ma y Bisby, 1997) sugieren que el incremento de Gal estaría asociado con el desarrollo de dolor neuropático luego de la lesión de un nervio periférico.

Usando el mismo paradigma de Kerr y cols. (Kerr et al., 2000) como control positivo, encontramos una disminución dramática y persistente en el umbral de dolor en la pata posterior de la rata luego de la infusión i.t. de dosis bajas de galanina, confirmando el rol pronociceptivo del péptido. Inclusive, detectamos una hiperalgesia termal moderada, la cual no fue reportada por Kerr y cols. (Kerr et al., 2000). Aún más, la infusión i.t. de dosis equimolares de los agonistas de receptores para galanina AR-M1896 y AR-M961, los cuales poseen la misma afinidad y actividad funcional a nivel de los RGal2, indujo los mismos efectos observados para galanina en la sensibilidad mecánica y térmica, indicando que los RGal2 mediarían la acción excitatoria de galanina en la médula espinal.

Sin embargo, existe evidencia de que niveles/dosis altos de galanina tendrían efectos antinociceptivos. Tal es así, que la aplicación i.t. de 1  $\mu$ g o más de Gal inhibe el reflejo nocifensivo en ratas espinalizadas (Wiesenfeld-Hallin et al., 1989a, b) así como normales (Cridland y Henry, 1988; Wiesenfeld-Hallin et al., 1993), en contraste con el

efecto facilitatorio de dosis bajas indicado más arriba. De hecho, dosis muy altas ( $\geq 10$   $\mu\text{g}$ ) de Gal exógena alivian las conductas de dolor neuropático luego de la injuria de un nervio periférico (Hao et al., 1999; Yu et al., 1999). En trabajos previos (Liu y Hökfelt, 2000), hemos examinado el efecto de la galanina exógena y endógena en la conducta dolorosa en ratas alodínicas y no-alodínicas tratadas con el modelo de Bennett. Es interesante observar que los niveles de galanina en los GARDs de ratas alodínicas y no-alodínicas son diferentes (23% vs. 43%, respectivamente) (Shi et al., 1999). Aquí, encontramos que la galanina i.t. induce un efecto antialodínico en ratas alodínicas, apoyando reportes previos (Hao et al., 1999; Yu et al., 1999). Es más, en ratas no-alodínicas con ICC, el antagonista putativo de galanina M35 (ver refs. en (Bartfai et al., 1992), aplicado por la vía i.t., indujo un estado alodínico de larga duración en un modo dosis-dependiente, indicando que niveles altos de galanina endógena producen una inhibición tónica en los procesos de dolor a nivel espinal luego de la lesión neural (Liu y Hökfelt, 2000). En el presente estudio, la aplicación i.t. del AR-M961 incrementó el umbral de von Frey en forma dosis-dependiente en ratas alodínicas, mientras que no se observó ningún cambio en el umbral de dolor al usar el agonista selectivo de RGal2, AR-M1896 o el vehículo. De este modo, el efecto antialodínico producido por galanina en ratas con lesión neural parece estar mediado por RGal1.

Nosotros también estudiamos el efecto de dos agonistas galaninérgicos en el umbral mecánico en ratas con ICC no-alodínicas. Ninguno de ellos indujo cambios significativos, aún cuando ambos son capaces de activar RGal2, los cuales median los efectos excitatorios de galanina en ratas sin lesión neural.

Estudios de autoradiografía han mostrado una densidad alta de sitios de unión para Gal en las láminas I y II en la médula espinal de ratas (Melander et al., 1988; Kar y Quirion, 1992; Zhang et al., 1995a). Por su parte, estudios de hibridación *in situ*

muestran que en condiciones normales, el ARNm de RGal1 se expresa en alrededor del 20% de todos los PNs de los GARDs L4-5, en neuronas de tamaño grande y mediano (O'Donnell et al., 1999), mayormente en neuronas que expresan también CGRP (Xu et al., 1996b). Asimismo, alrededor de 25% de todos los PNs de los GARDs expresan ARNm para RGal2, usualmente de tamaño pequeño, con un 80% de colocación con ARNm de CGRP y cerca de 20% con ARNm para RGal1 (Shi et al., 1997; O'Donnell et al., 1999). Hasta el momento, la expresión del RGal3 en GARDs y médula espinal se ha detectado sólo por medio de PCR de transcripción reversa (RT-PCR) y el ensayo de hibridación/protección de ARNasas. Sin embargo, sus niveles fueron siempre más bajos que aquellos observados para los ARNm de los receptores RGal1 y -2 (Waters y Krause, 2000).

En la médula espinal de la rata, muchas de las neuronas intrínsecas de las láminas I y II expresan el ARNm del RGal1, aunque algunas neuronas hacen lo propio en las láminas III-V, mientras que son pocas las neuronas que expresan el ARNm del RGal2 en la médula espinal (Parker et al., 1995; Gustafson et al., 1996; O'Donnell et al., 1999). Así, en condiciones normales los principales receptores asociados a la transmisión del dolor a nivel espinal son el RGal1 en neuronas intrínsecas del asta dorsal y el RGal2 en neuronas de los GARDs, aunque no se cuenta con evidencias del transporte central de estos receptores hacia el asta dorsal. Aún así, un estudio electrofisiológico paralelo analizando el efecto de AR-M1896 y AR-M961 en neuronas del locus coeruleus, las cuales contienen el ARNm de ambos receptores para Gal (O'Donnell et al., 1999), indica que el RGal1 es postsináptico y el RGal2 es presináptico (X. Ma, Y.-G. Tong, W.B., K. P., L. H., C. P., C. G., y Z.-Q.D. Xu, resultados no publicados). Así, podría especularse que la inyección i.t. de dosis bajas de Gal podría afectar a RGal2s presumiblemente presentes en las terminales aferentes primarias del

asta dorsal, activando vías de fosfolipasa C a través de proteína Gq, aumentando la concentración de  $Ca^{2+}$  (Smith et al., 1997; Wang et al., 1998) y estimulando la transmisión nociceptiva por modulación de la secreción de neurotransmisores coexistentes, como por ejemplo glutamato, SP, y/o CGRP. El rol inhibitorio, principalmente observado luego de la injuria del nervio y usualmente inducida por dosis altas de galanina, podría resultar principalmente de la inhibición de la producción del AMPc mediado por RGal1 acoplados a proteínas Gi (Parker et al., 1995; Wang et al., 1998) en neuronas intrínsecas de la médula espinal.

Estudios de hibridación *in situ* muestran que el número de PNs ARNm-positivos para los receptores RGal1 y -2 es reducido luego de la axotomía (Xu et al., 1996b; Shi et al., 1997). Sumado a esto, la sección completa del nervio ciático indujo una disminución en los sitios de binding de Gal en el asta dorsal (Kar y Quirion, 1992), reflejando quizás la disminución de la síntesis de RGal1 y -Gal2 en los GARDs. Por otro lado, la axotomía no tuvo efecto en la expresión del ARNm para RGal1 en neuronas del asta dorsal (Zhang et al., 1998b). La disminución de ambos receptores en los GARDs luego de la lesión neural podría además influir su transporte hacia la médula espinal, efecto de especial relevancia para los RGal2 ya que favorecería el efecto postsináptico inhibitorio a través de RGal1 presentes en neuronas del asta dorsal. Esto apoyaría los resultados en los que el agonista para RGal2 AR-M1896 falló, inclusive a dosis altas, en inducir un efecto excitatorio en ratas con ICC no-alodínicas, en contraposición con lo observado en ratas normales. También se correlaciona con el aumento en el rol inhibitorio que la galanina endógena adquiere luego de la lesión nerviosa periférica (Wiesenfeld-Hallin et al., 1989b; 1992b) y con el efecto inhibitorio que la aplicación de Gal i.t. tuvo en algunas ratas con modelos de dolor neuropático (Hao et al., 1999; Yu et al., 1999; Liu y Hökfelt, 2000). De acuerdo con todo esto, los

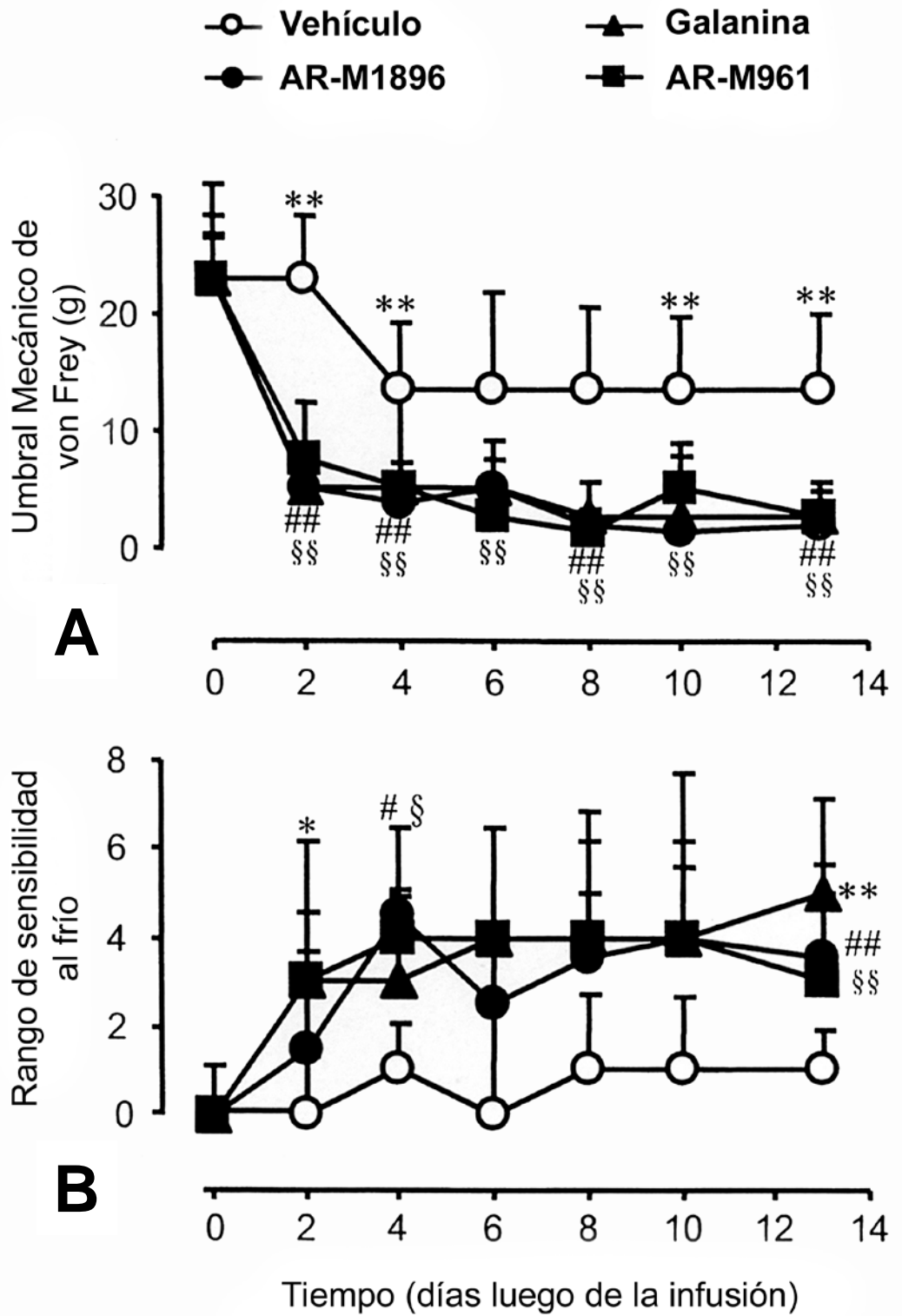
presentes resultados obtenidos en ratas alodínicas afectadas con el modelo de Bennett son compatibles con el punto de vista de que es el RGal1 y no el RGal2 el que participa en los efectos inhibitorios de galanina en la conducta de dolor. Es sabido que los GARDs humanos expresan galanina (Zhang et al., 1998b), aunque todavía falta información acerca de la expresión de receptores para este péptido. Si la situación es similar en humanos y ratas, las posibilidades de usar agonistas selectivos para los RGal1 para el tratamiento de dolor neuropático resulta plausible.

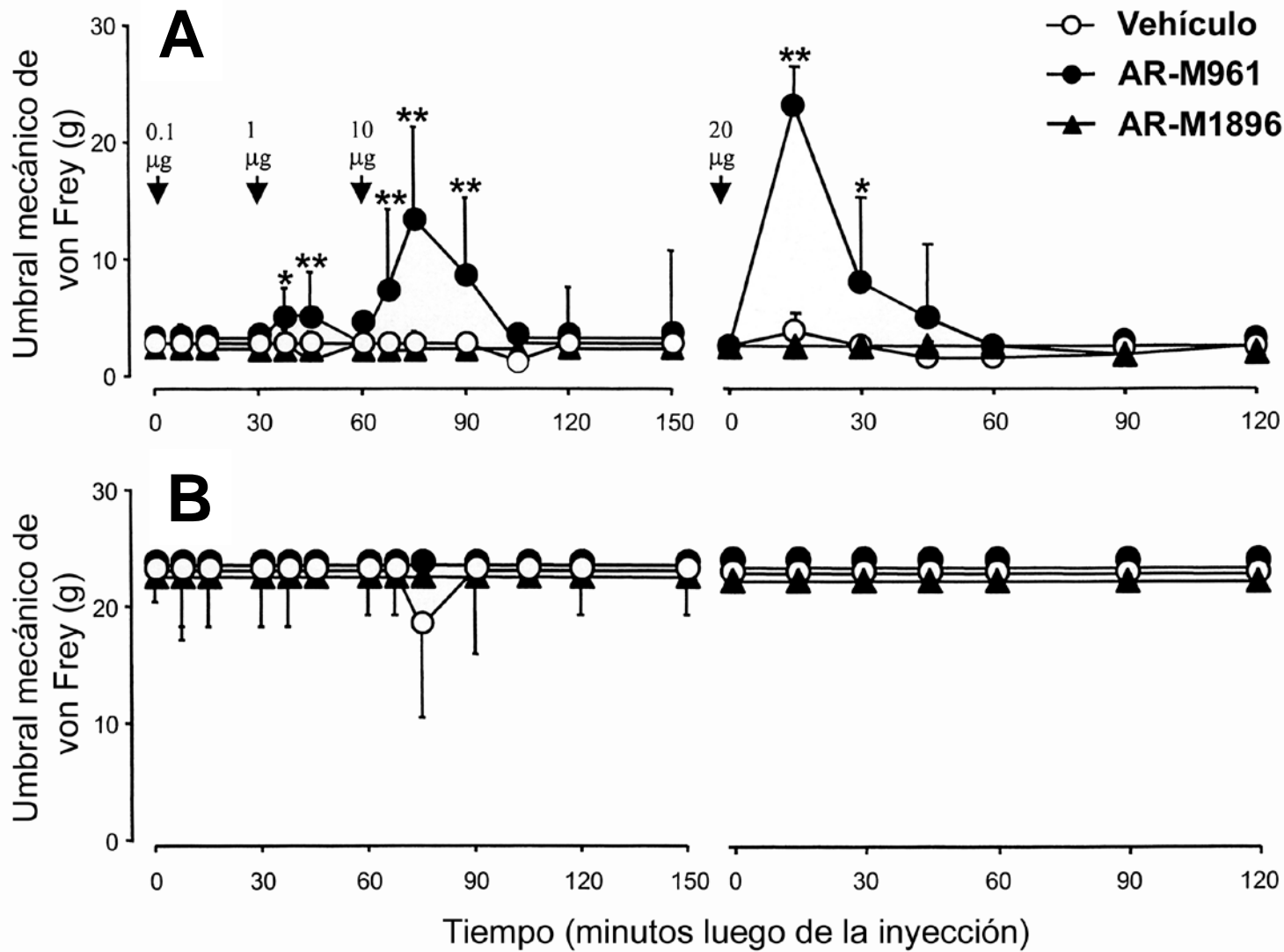
Análogo	Secuencia	Binding IC <sub>50</sub> , nM		hRGal1/ rRGal2	FLIPR hRGal2 EC <sub>50</sub> , nM	GTP[γS] hRGal1 EC <sub>50</sub> , nM
		rRGal2	hRGal1			
<i>hGal</i>	Galanina humana	1.00	0.23	0.23	6.25	10.7
<i>AR-M1717</i>	Gal(1-11)-NH <sub>2</sub>	1.65	1.10	0.66	6.29	4400
<i>AR-M1896</i>	Gal(2-11)-NH <sub>2</sub>	1.76	879	500	9.32	—*
<i>AR-M961</i>	[Sar <sup>1</sup> , D-Ala <sup>12</sup> ]gal(1-16)-NH <sub>2</sub>	1.74	0.403	0.23	7.12	164

FLIPR, lector de imágenes fluorescentes; GTP[γS], guanosina 5'[γ-thio]trifosfato.

\*No testeado ya que los ensayos de binding mostraron un IC<sub>50</sub> de 879 nM. Todos los análogos mostraron que el binding en el rango nanomolar alto es acompañado por una pérdida casi completa de la activación del RGal1.







# Capítulo VII

**Los receptores Y1 para el NPY están presentes en los procesos axonales de las neuronas de los ganglios anexos a la raíz dorsal**

## Introducción

Hasta el momento se han clonado cinco subclases de receptor para el NPY, pertenecientes a la familia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a la proteína G (Larhammar, 1996; Gehlert, 1998). Varios estudios de cultivo celular/electrofisiología (Walker et al., 1988; Bleakman et al., 1991; Abdulla y Smith, 1999a), binding (Kar y Quirion, 1992; Ghilardi et al., 1994; Mantyh et al., 1994; Zhang et al., 1995d), hibridación *in situ* (Jazin et al., 1993; Zhang et al., 1994a; 1997) e inmunohistoquímica (Zhang et al., 1994b; 1999) proveen evidencias para la expresión de los RY1 e -Y2 en neuronas sensoriales. En GARDs de ratas normales, el RY1 se expresa en casi el 25% de todas las neuronas, principalmente en neuronas pequeñas y algunas medianas (Jazin et al., 1993; Zhang et al., 1994a, b; 1999). La mayoría de estas neuronas expresa CGRP y en alguna proporción, SP (Zhang et al., 1994a, b; 1999). La falta de evidencia para el transporte centrífugo del RY1, testeado en experimentos con ligadura del nervio ciático o la rizotomía dorsal (Zhang et al., 1994a), le valió a este receptor la clasificación como postsináptico (Wahlestedt et al., 1986). De hecho, un denso plexo de procesos RY1-IR en la lámina II del asta dorsal parecería originarse exclusivamente en neuronas locales (Zhang et al., 1994a). Por su parte, el mensajero del RY2 se halla localizado principalmente en neuronas grandes de los GARDs que expresan CGRP (Zhang et al., 1997) y es transportado centrífugamente hacia el asta dorsal, especialmente luego de la axotomía (Zhang et al., 1995a). En este contexto, el RY1 sería un receptor exclusivamente somático localizado en neuronas pequeñas de los GARDs (Colmers et al., 1991; Potter et al., 1992; Zhang et al., 1994b; Zhang et al., 1999) actuando como un receptor postsináptico, mientras que el RY2, al ser transportado centrífugamente hacia el asta dorsal especialmente luego de la axotomía

(Zhang et al., 1995a), actuaría como un autoreceptor en aferencias primarias (Zhang et al., 1997) o sería activado por neuronas locales productoras de NPY (Gibson et al., 1984a].

Sin embargo, trabajos más recientes han mostrado la localización presináptica del RY1. Estudios de microscopía electrónica han demostrado la presencia del RY1 en axones del núcleo accumbens (Pickel et al., 1998), y se ha observado su expresión en neuronas hipocampales *in vitro* (St-Pierre et al., 2000) así como en neuronas trigeminales durante el desarrollo (Ubink et al., 2001). Inclusive, estudios practicados en ratones RY1-KO sugieren la participación del RY1 en eventos presinápticos en neuronas sensoriales primarias (Naveilhan et al., 2001).

En base a estas evidencias, nosotros hemos reexaminado la localización de la inmunoreactividad del RY1 en neuronas adultas en los GARDs contra- e ipsilateral y sus proyecciones de ratas afectadas con diferentes tipos de lesión, usando una técnica inmunohistoquímica altamente sensible, el método de amplificación de la señal por tiramida (TSA), originalmente descrito por Adams (Adams, 1992).

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Para los experimentos se utilizaron 9 ratas Sprague Dawley macho (200-250 g; B & K Universal, Estocolmo, Suecia). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (12 hs ciclo día/noche) con acceso libre a agua y comida. Todas las ratas fueron anestesiadas usando pentobarbital sódico (Mebumal; 60mg/kg, i.p.) antes de cualquier intervención quirúrgica. En tres ratas, la médula espinal lumbar fue expuesta por laminectomía de los últimos segmentos vertebrales lumbares, y las raíces dorsales izquierdas desde lumbar 1 (L1) hasta sacra 3 (S3) fueron seccionadas. En seis ratas el

nervio ciático izquierdo fue intensamente comprimido por 30 segundos a nivel de la mitad del muslo de la pata de la rata, con ayuda de fórceps finos (compresión breve).

Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con lo establecido por la Society for Neuroscience respecto del uso de animales en neurociencia, y fueron aprobados por el comité ético local sueco para el uso de animales (Stockholms Norra Djurförsöksetiska Nämnd).

### **Inmunohistoquímica**

**Preparación del tejido.** Luego de 24 horas, los animales con los nervios ciáticos comprimidos fueron reanestesiados (como se indicara más arriba) y perfundidos a través del corazón con 50 ml de buffer Tyrode a 37°C, seguido de 50 ml de una mezcla de 4% de para-formaldehído y 0.2% de ácido pícrico 0.16 M en buffer fosfato (BF, pH 6.9) a 37°C, y finalmente con 300 ml del mismo fijador a 4°C (Zamboni y De Martino, 1967). Los animales con rizotomía dorsal fueron procesados de la misma manera, 12 días después de la operación. Los nervios contra- e ipsilateral, las raíces dorsales y los GARDs, los niveles correspondientes de la médula espinal, así como la piel del aspecto plantar de la pata posterior de la rata fueron extraídos y sumergidos en el mismo fijador por 90 min a 4°C. El fijador fue luego reemplazado por sucrosa al 10 % diluída en buffer fosfato salino (PBS; pH 7.2) conteniendo 0.01% de azida sódica (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 0.02 % de bacitracina (Sigma) y mantenido durante 48-72 horas.

**Protocolo de incubación.** Los tejidos fueron incluídos en OCT (Tissue Tek, Sakura Kinetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands), y seccionados en un crióstato (Microm, Heidelberg, Germany) (a 10 µm de grosor los nervios ciáticos y las raíces dorsales; a 14 µm de grosor los DRGs y la piel de la planta de la pata, y a 20 µm de

grosor la médula espinal), y montados en portaobjetos gelatinizados con gelatina y alumbre de cromo.

Se utilizó un kit comercial (TSA plus, NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, Inc.; Boston, MA, USA) para los experimentos de inmunohistoquímica. Las secciones (n=34) fueron lavadas en PBS e incubadas durante la noche en una cámara húmeda a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con la keyhole limpet hemocyanin y dirigido contra los últimos 13 aminoácidos del segmento C-terminal del RY1 (1:8000) (Kopp et al., 2002) diluido en PBS conteniendo 0.2% (p/v) de albúmina de suero bovino, 0.03% de Triton X-100 (Sigma), y 0.1% (p/v) de azida sódica (Sigma). Este anticuerpo no tiñe neuronas periféricas y centrales en ratones RY1-KO, aunque permanece inalterado en ratones RY2-KO (Ubink et al., 2001; Kopp et al., 2002). Algunas secciones alternadas fueron incubadas con el anticuerpo contra RY1 prebloqueado con el péptido inmunogénico, a una concentración de  $10^{-5}$  M. Los portaobjetos fueron lavados en TNT (kit) por 15-20 min a temperatura ambiente (TA), posteriormente bloqueados con TNB (kit) por 30 min a TA, y luego incubados con peroxidasa del rábano picante-conjugado con el anticuerpo secundario (Dako, Glostrup, Denmark) diluido 1:200 en TNB por otros 30 min a TA. Pasado este tiempo, las secciones se lavaron en TNT por 15-20 min y se incubaron con un conjugado de tiramida-FITC diluido 1:100 en diluyente de amplificación (kit) durante aproximadamente 10 min. Finalmente, los portaobjetos fueron lavados en TNT por 15-20 min a TA y montados con glycerol/PBS (9:1) conteniendo 0.1 % para-fenilenediamine (Johnson y Nogueira Araujo, 1981; Platt y Michael, 1983).

Los experimentos de doble-tinción fueron llevados a cabo en un segundo paso usando un anticuerpo policlonal de conejillo de indias contra CGRP (1:400; Peninsula) ó ya fuera un anticuerpo monoclonal producido en ratón contra el NPY (1:400)

(Grouzmann et al., 1992) o contra el producto protéico del gen 9.5 (PGP 9.5) (1:100; 31A3; Ultraclone, Wellow, England), utilizado aquí como un marcador de nervios periféricos (Thompson et al., 1983; Wilson et al., 1988), seguido de la incubación con anticuerpos de burro anti-conejillo de indias ó anti-ratón conjugados respectivamente con LRSC ó Cy3 (1:80; ambos de Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA).

Las secciones fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot-FX. La señal de FITC fue analizada usando un filtro Nikon B-1E (excitable a  $480\pm 10$  nm con un filtro de emisión de 520-550 nm). La fluorescencia producida por LRSC y Cy3 fue visualizada usando un filtro Nikon G-1B (excitable a  $546\pm 5$  nm con un filtro de emisión de 590 nm). Se tomaron fotografías blanco y negro en film Kodak T-400.

Las secciones también fueron analizadas en un microscopio de escaneado confocal Biorad Radiance Plus (Biorad, Hemel Hempstead, UK) instalado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (Tokyo, Japan) equipado con objetivos de 10 x (0.45 N. A.), 20 x (0,75 N. A.) y 60 x de aceite (1,40 N. A.). La fluoresceína fue excitada usando la línea de 488 nm del láser de argón y detectada luego de pasar por un filtro de emisión HQ 530/60 (Biorad). Para la detección de LRSC y Cy3, se usó la línea de 543 nm del láser HeNe verde en combinación con el filtro de emisión HQ 570 (Biorad). Las fibras del nervio ciático RY1-, CGRP- y NPY-IRs fueron escaneadas en secciones ópticas de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor, mientras que los GARDs y la médula espinal lo fueron a 1  $\mu\text{m}$  de grosor y las secciones de piel a 0.10  $\mu\text{m}$  de grosor. Las secciones fueron analizadas separadamente y luego mezcladas para mostrar posibles sitios de colocalización.



## **Procesado digital de las imágenes**

Las imágenes digitales obtenidas con el microscopio confocado fueron optimizadas para resolución de la imagen, brillo y contraste usando el programa Adobe PhotoShop 5.5 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA). Las imágenes no fueron modificadas por adición o sustracción de ningún detalle. Finalmente, las imágenes fueron impresas con una impresora Epson Stylus™ Photo EX (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan).

## **Resultados**

### ***Ganglio anexo a la raíz dorsal***

En GARDs normales, varios cuerpos neuronales mostraron una intensa inmunoreactividad para el RY1 (Figs. VII.1a, b) al igual que numerosos vasos sanguíneos (Fig. VII.1a, b). Muchas de estas neuronas exhibieron procesos axonales RY1-IR que en algunas ocasiones se continuaron en la división del axón pseudounipolar en sus dos ramas principales, típicas de las neuronas sensoriales primarias (Fig. VII.1b). Asimismo, se observaron numerosas fibras positivas entre las neuronas o formando conglomerados fibrosos (Fig. VII.1a).

### ***Nervio ciático***

Luego de la compresión unilateral, la inmunoreactividad para el RY1 fue observada con un patrón similar a un punteado en ambos nervios ciáticos, derecho e izquierdo en varias fibras finas. Se pudo observar una intensa acumulación del RY1 en fibras aparentemente distendidas, proximal y muy cerca del sitio de compresión breve (Fig. VII.2a, c), y también a cierta distancia de la lesión (Fig. VII.2b, e). También se observó inmunoreactividad para el RY1 en las paredes de los vasos dentro y alrededor

del nervio (Fig. VII.1c). Algunas fibras aisladas en el lado distal de la lesión mostraron cierta tinción para el RY1.

En experimentos de doble-tinción (Fig. VII.3a, d) se pudo observar la colocalización del RY1 (Fig. VII.3b, e) y CGRP (Figs. VII.3c, f), especialmente en fibras muy finas a cierta distancia respecto del lado proximal de la compresión. Asimismo, cerca del sitio de compresión, se constató este patrón de colocalización en nervios intensamente dilatados (Fig. VII.2c, d). Por otro lado, a cierta distancia del sitio de compresión, algunas fibras aparentemente mielínicas muy dilatadas exhibieron inmunoreacción para el CGRP, siendo RY1-negativas (Fig. VII.3a, c, d, f). Se observó también la acumulación clara de inmunoreactividad para el NPY proximal y cerca del sitio de compresión (Fig. VII.3i), pero no se pudo establecer la colocalización con el RY1 (Fig. VII.3b, g).

### *Piel de la región plantar*

En la planta de la pata contralateral de ratas lesionadas, se encontraron fibras RY1-IR en pequeños manojos de fibras nerviosas en la dermis (Fig. VII.3k, n), así como algunas fibras sensoriales finas positivas para el receptor en el epitelio (Fig. VII.4b).

Experimentos de doble tinción mostraron la coexistencia del RY1 con CGRP (Fig. VII.3j-l) y PGP 9.5 (Fig. VII.3m-o) en la piel, ambos en fibras de los manojos nerviosos, así como en fibras del epitelio (Figs. VII.4a-c).

*Raíces dorsales y médula espinal lumbares*

En las raíces dorsales L5 encontramos numerosas fibras RY1-IR y algunos vasos sanguíneos fuertemente teñidos con el anticuerpo para el receptor (Fig. VII.1d). Por otro lado, se observó una banda de cuerpos celulares y procesos intensamente RY1-IR en la lámina II del asta dorsal, con una marca más suave y menos densa en las láminas I, III y IV (Fig. VII.5a, c). Además, algunas neuronas grandes RY1-IR fueron halladas en las láminas más profundas (IV-VI) del asta dorsal (Figs. VII.4g, h; 5a). Luego de la rizotomía dorsal no se observaron cambios significativos en la expresión del RY1 en los lados contra- e ipsilateral a la lesión (comparar Fig. VII.5a, c con 5b, d).

Los experimentos de doble tinción revelaron la colocalización del RY1 con CGRP en fibras aisladas de las raíces dorsales. En ningún caso se observó colocalización con NPY. La rizotomía dorsal indujo una disminución casi completa de la expresión para CGRP en el asta dorsal de la médula espinal lumbar (comparar Fig. VII.5f con 5e), mientras que no se observaron cambios evidentes en la expresión del RY1 comparando los lados contra- e ipsilateral. Así, se pudo observar fluorescencia amarilla (por la mezcla de los colores verde del RY1 y rojo del CGRP) en estructuras punteadas en las láminas más superficiales (Fig. VII.4d-f). También se observó, ipsilateral a la rizotomía dorsal, un incremento de CGRP pero no del RY1 en la raíz dorsal entrante al asta dorsal (Fig. VII.5f). Esto no se detectó en el lado contralateral a la lesión (Fig. VII.5e). Cerca de algunas neuronas grandes RY1-IR presentes en láminas profundas se hallaron en ciertas ocasiones fibras positivas para CGRP (Fig. VII.4g-i), así como unas pocas fibras colocalizando el péptido y el receptor (Fig. VII.4g-i).

## Controles

El prebloqueo con el péptido inmunogénico del anticuerpo contra el RY1 causó la desaparición de todos los patrones de tinción descritos más arriba, incluyendo los GARDs (Fig. VII.1e), el nervio ciático normal (Fig. VII.1f) y a nivel de la compresión breve (Fig. VII.2b) así como la piel (resultado no mostrado). Sin embargo, numerosas células, probablemente macrófagos, en los nervios ciáticos comprimidos por el crush, resistieron el bloqueo (Fig. VII.2b). Asimismo, los patrones de tinción para CGRP y el NPY desaparecieron luego del bloqueo con el péptido correspondiente.

**Fig. VII.1.** Microfotografías confocales (a, b, e) y ópticas (c, d, f) de secciones de neuronas de GARDs lumbares (a, b, e), nervio ciático (c, f) y raíces dorsales lumbares no lesionadas (d) luego de la incubación con el anticuerpo contra el RY1 (a-d) y el anticuerpo prebloqueado (e, f). En los GARDs se observan varios PNs RY1-IR que muestran claramente axones inmunoreactivos (cabeza de flecha grande en b) con dos proyecciones principales (cabezas de flecha pequeñas en b). A su vez, los nervios ciáticos no lesionados (c) y las raíces dorsales (d) contienen numerosas fibras (cabezas de flecha pequeñas) RY1-IR con un patrón punteado típico. Las flechas grandes muestran vasos sanguíneos RY1-IR presentes en los GARDs, b), el nervio ciático (c) y las raíces dorsales (d). La absorción del anticuerpo con el péptido del RY1, indujo la desaparición de todas las señales mostradas en los GARDs (e) y el nervio ciático (f). Barras de calibración: 20  $\mu\text{m}$  para (a, b); 50  $\mu\text{m}$  para (c-e); 100  $\mu\text{m}$  para (f).

**Fig. VII.1.** Immunofluorescence confocal (a, b, e) and optic (c, d, f) micrographs of sections of nonlesioned lumbar DRG neurons (a, b, e), sciatic nerve (c, f), and lumbar dorsal root (d) after incubation with Y1R antiserum (a-d) and control serum (e, f). In the DRGs, several Y1R-IR positive neurons show a clear immunoreactive axon (large arrowhead in b) with two main branches (small arrowheads in b). In nonlesioned sciatic nerves (c) and dorsal roots (d) numerous fibers (small arrowheads) contain Y1R-LI with a typical dot-like pattern. The large arrows indicate Y1R-IR blood vessels present in DRG (a, b), sciatic nerve (c) and the dorsal root (d). After adsorption with the peptide, all signals disappear in the DRG (e) and the sciatic nerve (f). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  for (a, b); 50  $\mu\text{m}$  for (c-e); 100  $\mu\text{m}$  for (f).

**Fig. VII.2.** Microfotografías de inmunofluorescencia de secciones del nervio ciático después de 1 día de crush, incubadas con el anticuerpo contra el RY1 (a, c) y el CGRP (d). Las flechas grandes indican el lado proximal a la lesión del nervio con una acumulación muy evidente de la inmunoreactividad para el RY1 (a, c), la cual desaparece por bloqueo con el péptido (b). Nótese las numerosas imágenes punteadas (a) las cuales persisten en secciones incubadas con el anticuerpo bloqueado (b), probablemente macrófagos. La magnificación de las fibras RY1-IR distendidas, proximales y muy cerca del sitio de compresión, muestran la colocación del RY1 y el CGRP en secciones con doble tinción (flechas abiertas en c, d). Barras de calibración: 250  $\mu\text{m}$  para (a, b); 100  $\mu\text{m}$  para (c, d).

**Fig. VII.2.** Immunofluorescence micrographs of sections of a sciatic nerve 1 day after crush and after incubation with antiserum to Y1R (a, c) and CGRP (d). The large arrows indicate the proximal side of the lesioned nerve with distinct accumulations of Y1R-LI (a, c), not seen after adsorption with the peptide (b). Note numerous dot-like signals (a) also seen in sections incubated with control serum (b), probably representing macrophages. Higher magnification images of distended Y1R-IR fibers, proximal and very close to crush, show colocalization of Y1R- and CGRP-Lis in a double-stained section (open arrows in c, d). Scale bars: 250  $\mu\text{m}$  for (a, b); 100  $\mu\text{m}$  for (c, d).

**Fig. VII.3.** Microfotografías confocal de secciones del nervio ciático 1 día después de la compresión del nervio ciático (a-i) y ramas del mismo nervio no lesionado en la piel de la pata posterior de la rata (j-o), con tinción doble para el RY1 (b, e, h, k, n) y el CGRP (c, f, l), el NPY (i) ó la PGP 9.5 (o). (a, d, g, j, y m) muestran la fusión de los distintos colores para cada marcador. El segmento más alejado de la zona de compresión en el extremo proximal a la lesión (a, d) algunas fibras RY1-IR también muestran la colocalización con CGRP (cabezas de flecha). Se observan algunas fibras RY1-IR (flechas pequeñas) así como también algunos pocos axones distendidos tan sólo positivos para CGRP (cabezas de flecha doble), probablemente correspondientes a motoneuronas. Por el contrario, no se detectó una clara colocalización entre el RY1 (h) y el NPY (i, g); más bien las fibras tiñen para el RY1 (flechas pequeñas en g, h) o el NPY (cabezas de flecha doble en g, i). Varios fascículos de nervios en la piel (j, m), ya sea en secciones transversales (j-l) o longitudinales (m-o), muestran la colocalización del RY1 con CGRP ó PGP 9.5 (cabezas de flecha). Algunas fibras PGP 9.5-IR en la piel no expresan el RY1 (cabezas de flecha doble en m-o). Las flechas grandes indican vasos sanguíneos intensamente inmunoreactivos para el RY1 (j, k). Barras de calibración: 25  $\mu\text{m}$  para (a-f), (j-l); 100  $\mu\text{m}$  para (g-i); 10  $\mu\text{m}$  para (m-o).

**Fig. VII.3.** Immunofluorescence confocal micrographs of sections of a sciatic nerve 1 day after crush (a-i) and branches of a nonlesioned sciatic nerve in the hindpaw skin (j-o), double stained for Y1R (b, e, h, k, n) and CGRP (c, f, l), NPY (i) or PGP 9.5 (o). a, d, g, j, and m show merged staining color. Far proximal to the lesion (a, d) some Y1R-positive fibers show colocalization with CGRP (arrowheads). Some single-stained Y1R-positive fibers are seen (small arrows) as well as a few distended CGRP-only-positive axons (double arrowheads), probably representing motoneuron axons. No clear colocalization of Y1R (h) and NPY (i) is detected (g), but fibers are stained for either Y1R (small arrows in g, h) or NPY (double arrowheads in g, i). Many nerve bundles in the skin (j, m), either transversally (j-l) or longitudinally (m-o) cut, show colocalization of Y1R and CGRP or PGP 9.5 (arrowheads). Some PGP 9.5-IR fibers in the skin do not colocalize Y1R (double arrowheads in m-o). Large arrows indicate intensely Y1R-positive blood vessels (j, k). Scale bars: 25  $\mu\text{m}$  for (a-f), (j-l); 100  $\mu\text{m}$  for (g-i); 10  $\mu\text{m}$  for (m-o).

**Fig. VII.4.** Microfotografías confocal de secciones de piel de la pata posterior (a-c) y el asta dorsal lumbar (d-i) en el lado contralateral de ratas lesionadas, con doble tinción para los anticuerpos dirigidos contra el RY1 (b, e, h) y el CGRP (c, f, i). Las proyecciones más periféricas del nervio ciático contienen inmunoreactividad para el RY1 (b) el cual colocaliza con CGRP (cabezas de flecha en a-c). A su vez, se observan muchos vasos sanguíneos RY1-IR (flechas grandes en a, b). En el asta dorsal lumbar superficial, se observa una fuerte banda RY1-IR (flechas pequeñas en d, e), la cual parece no colocalizar con CGRP (flechas dobles en d, f); sin embargo, varios “puntos” amarillos pueden ser vistos en las láminas I y II. En láminas más profundas (III-V) (g-i), se ven claramente neuronas RY1-positivas (cabezas de flecha grandes en g, h) y algunas de sus proyecciones (flechas pequeñas en g, h) corriendo paralelas a aferencias primarias CGRP-IR (cabezas de flecha doble en g, i). Ocasionalmente, fibras aisladas muestran la colocalización del RY1 y CGRP (cabezas de flecha pequeñas en g-i). Barras de calibración: 20  $\mu\text{m}$  para (a-c); 50  $\mu\text{m}$  para (d-i).

**Fig. VII.4.** Immunofluorescence confocal micrographs of sections of hindpaw skin (a-c) and lumbar dorsal horn (d-i) of the contralateral side of lesioned rats, double stained with antiserum to Y1R (b, e, h) and CGRP (c, f, i). Even the most peripheral projections of the sciatic nerve contain Y1R-LI (b) that colocalizes with CGRP (arrowheads in a-c). Many intensely Y1R-IR vessels are also seen (large arrows in a, b). In the lumbar superficial dorsal horn, a strong Y1R-IR band is observed (small arrows in d, e), mainly not colocalized with CGRP (double arrowheads in d, f); however, several yellow “dots” can be seen in both laminae I and II (arrowheads in d-f). In deeper laminae (III-V) (g-i), Y1R-positive neurons are clearly identified (large arrowheads in g, h), and some of their processes (small arrows in g, h) run in parallel with CGRP-IR primary afferents (double arrowheads in g, i). Occasionally, single fibers show colocalization of Y1R and CGRP (small arrowheads in g-i). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  for (a-c); 50  $\mu\text{m}$  for (d-i).



**Fig. VII.5.** Microfotografías ópticas de inmunofluorescencia de secciones del lado ipsilateral (b, d, f) y contralateral (a, c, e) del asta dorsal lumbar superficial 12 días después de una rizotomía dorsal incubadas con el anticuerpo contra el RY1 (a-d) y CGRP (e, f). No se observaron diferencias substanciales en la expresión del RY1 en el asta dorsal luego de la rizotomía dorsal (a-d). Una fuerte banda de neuronas espinales y sus proyecciones intensamente positivas para el receptor puede ser observada en la lámina II, mientras se aprecia una tinción menos intensa pero evidente en las láminas I, III-V (a-d). Además, se encuentran algunas neuronas profundas RY1-IR (cabezas de flecha en a). En contraste, la rizotomía dorsal induce una pérdida casi completa de la expresión del CGRP en el asta dorsal lumbar (comparar f con e). También, se destaca un incremento en la expresión para el CGRP en las raíces dorsales lesionadas (flecha curva en f). Barras de calibración: 100  $\mu\text{m}$  para (a-b), (e-f); 50  $\mu\text{m}$  para (c, d).

**Fig. VII.5.** Immunofluorescence micrographs of sections of ipsilateral (b, d, f) and contralateral (a, c, e) lumbar superficial dorsal horn 12 days after dorsal rhizotomy (a-d). A strong band of positive spinal neurons and their processes can be observed in lamina II, as well as a less intense but distinct staining in laminae I and III-V (a-d). Some Y1R-IR deeper neurons are also present (arrowheads in a). In contrast, a virtually complete loss of CGRP-LI is seen in the lumbar dorsal horn after dorsal rhizotomy (cf. F with e). There is an increase of CGRP-LI in the lesioned dorsal root (curved arrow in f). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  for (a-b), (e-f); 50  $\mu\text{m}$  for (c, d).

## Discusión

El presente estudio se enfoca en el primer receptor clonado del NPY, el RY1 (Eva et al., 1990; 1992; Herzog et al., 1992; Kar y Quirion, 1992), originalmente clasificado por Wahlestedt y cols. (1986) como un receptor postsináptico. Se describió la inmunoreactividad para el RY1 en una subpoblación de neuronas pequeñas RY1-IR en los GARDs lumbares, con una marca confinada a los cuerpos celulares y principalmente localizado cerca de la membrana plasmática, sin claras evidencias de transporte centrífugo (Zhang et al., 1994b). Del mismo modo, en los GARDs y el ganglio trigeminal del ratón adulto, el RY1 se halla presente en el soma neuronal (Shi et al., 1998; Naveilhan et al., 2001). Incluso, la compresión del nervio ciático y las raíces dorsales indujo la aparición de algunas escasas fibras RY1-IR aislada, proximal a la zona lesionada (Zhang et al., 1994b).

Más recientemente, Ubink y cols. (Ubink et al., 2001) demostraron la expresión transitoria del RY1 en proyecciones trigeminales presentes en las vibrisas de ratas embrionarias, con una intensa expresión entre los días E16.5 y E22, pero estuvo virtualmente ausente en neuronas adultas de los ganglios trigeminales (Ubink et al., 2001).

En el presente trabajo proveemos evidencia morfológica del transporte axonal del RY1 hacia la periferia y el asta dorsal en la rata adulta. Detectamos axones RY1-IR en el nervio ciático y las astas dorsales, que luego de la compresión breve exhibieron acumulación de inmunoreactividad para el receptor en el lado proximal a la lesión. Inclusive, se observó colocalización del receptor con CGRP, de acuerdo con trabajos previos que demuestran su expresión conjunta en neuronas pequeñas de los GARDs (Zhang et al., 1994a, b; 1995d), lo que apoya la presencia del RY1 en fibras sensoriales. El CGRP no sólo se expresa en neuronas sensoriales (Rosenfeld et al., 1983; Gibson et

al., 1984b), sino también en motoneuronas (Rosenfeld et al., 1983; Gibson et al., 1984b), aunque estas no parecen sintetizar RY1s, así como tampoco lo hacen las neuronas simpáticas (Zhang et al., 1997). También pudimos observar la acumulación de CGRP en un segundo tipo de fibras RY1-negativas a alguna distancia de la zona de compresión, las cuales presumiblemente corresponden a axones de motoneuronas (Cortés et al., 1990). La aparente discrepancia con nuestros trabajos previos (Zhang et al., 1994b; 1999) podría estar relacionada con el uso de una técnica de inmunohistoquímica más sensible (Adams, 1992), así como al uso de un anticuerpo mucho más afín (Kopp et al., 2002). Con esto en mente, es posible que la cantidad de proteína del RY1 transportada por vía axonal sea muy baja, requiriéndose de metodologías más sensibles para su visualización.

En la piel de la región plantar de la pata posterior de la rata hallamos fascículos nerviosos RY1-IR así como algunas fibras finas penetrando la epidermis, confirmando nuestras observaciones sobre el transporte periférico del receptor. Asimismo, fue más fácil observar fibras RY1-IR en los fascículos nerviosos hipodérmicos y dérmicos, más que en las capas superficiales de la dermis, sugiriendo que la cantidad del RY1 que finalmente alcanza la parte distal de la ramificación axonal es baja.

Un pregunta importante es si el RY1, sea transportado o no en forma centrífuga, es incorporado en la membrana de las terminales nerviosas y actúa como un receptor presináptico en la periferia y el asta dorsal, como ha sido sugerido por Pickel y sus colaboradores para este receptor en axones del núcleo accumbens (Pickel et al., 1998). De hecho, aún queda por demostrar que la proteína del receptor es incorporada al plasmalema de los axones de las neuronas aferentes primarias (Tiedge et al., 1999).

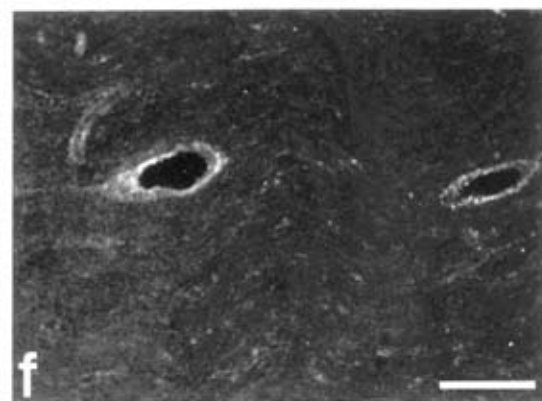
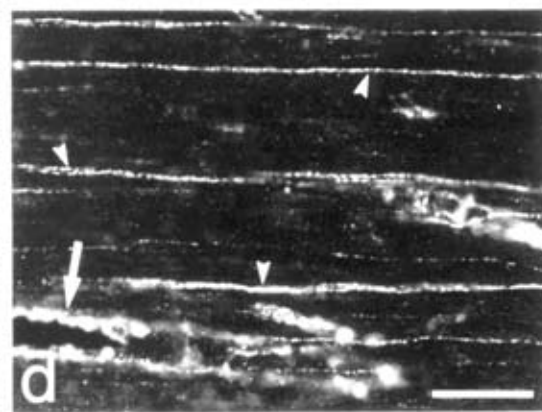
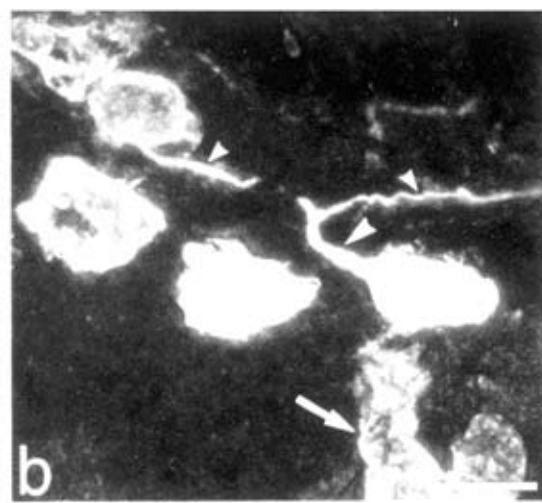
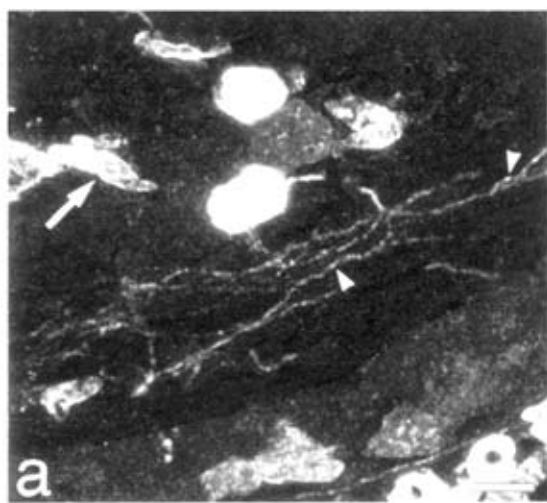
Ahora bien, mientras que la presencia de un denso plexo fibroso NPY-IR en el asta dorsal validaría la acción del RY1 en la médula espinal, cabe preguntarse acerca del

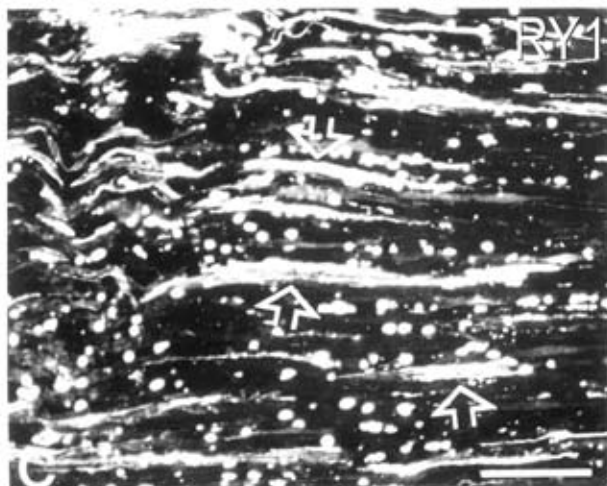
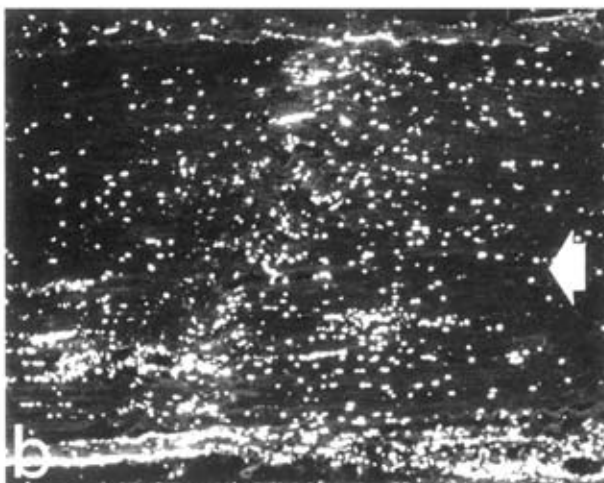
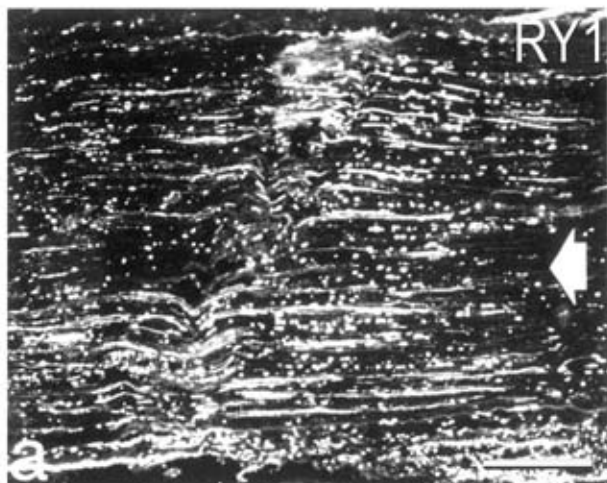
origen del NPY que actúa a través de los RY1s presentes en las terminales periféricas de los nervios sensoriales. Una posibilidad lo constituye el NPY circulante producido por células cromafines de la médula adrenal y/o fibras simpáticas (Lundberg et al., 1983; Allen et al., 1983a). Se sabe que el estrés y el ejercicio físico incrementan los niveles séricos de NPY (Pernow et al., 1986; Castagne et al., 1987; Morris et al., 1987; Zukowska-Grojec et al., 1996). Quizás suceda algo similar durante el estrés producido por lesiones inflamatorias de la piel. Así, este NPY de origen sanguíneo podría influenciar la sensibilidad dolorosa.

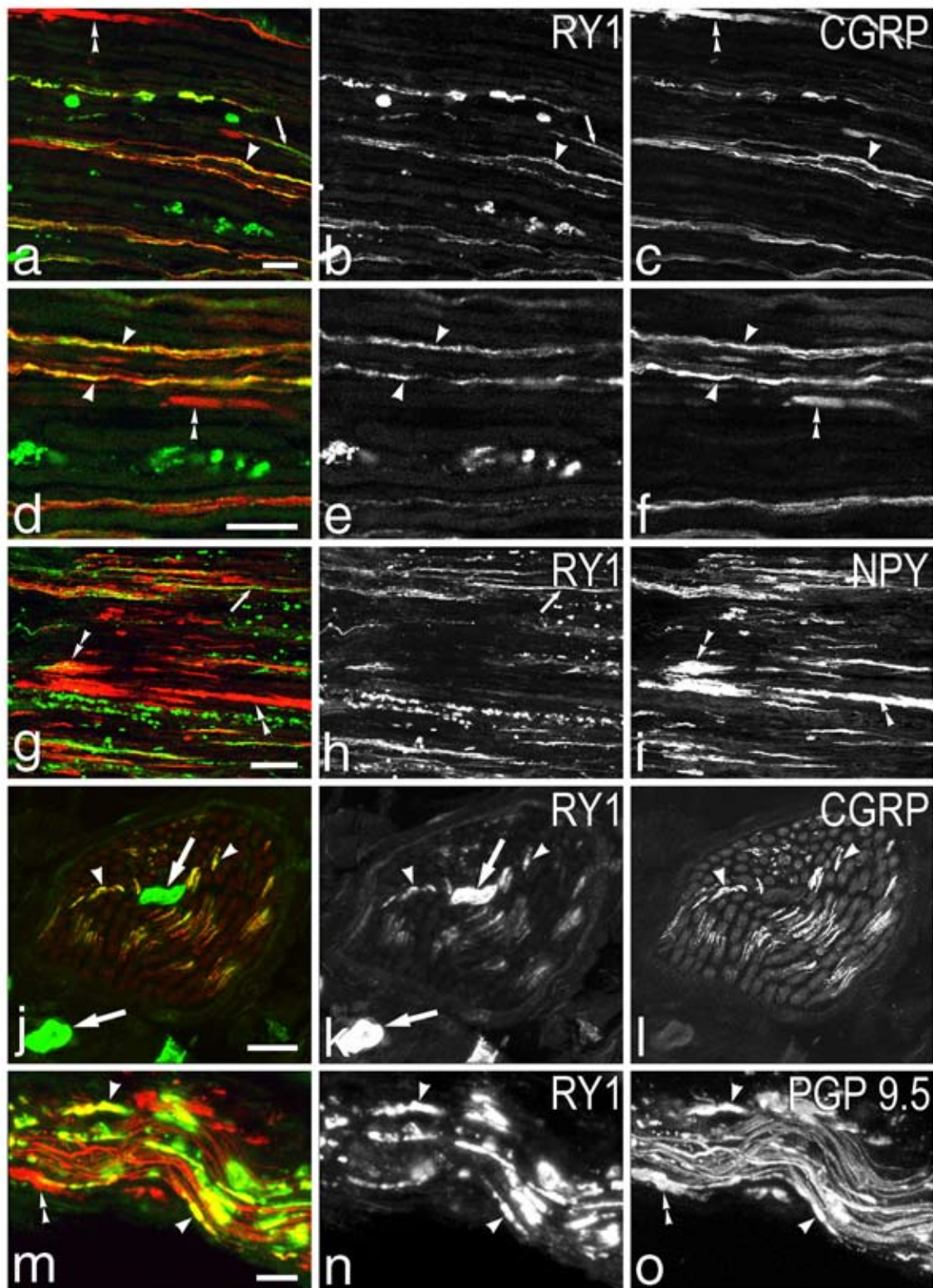
Por otro lado, la presencia y el rol del transporte central del RY1 permanece obscuro. Aquí, observamos inmunoreactividad para el RY1 principalmente en los cuerpos neuronales de las neuronas locales del asta dorsal y sus procesos fibrosos, como fuera demostrado anteriormente (Zhang et al., 1994b; 1999), mientras que la axotomía de las raíces dorsales no indujo cambios detectables en su expresión en el asta dorsal, al igual que en observaciones previas (Zhang et al., 1994a). Sin embargo, un pequeño número de presumibles terminales nerviosas con doble tinción para el CGRP- y el RY1 fueron vistas en el asta dorsal, las cuales fueron completamente abolidas luego de la rizotomía dorsal. Es posible que los niveles extremadamente altos de inmunoreactividad para el RY1 en neuronas del asta dorsal y sus procesos dendríticos estén enmascarando las aferencias primarias discretamente RY1-IR. De hecho, una débil inmunoreactividad para el RY1 fue descripta en estudios de microscopía electrónica de las fibras aferentes primarias presentes en algunos glomérulos del asta dorsal (Zhang et al., 1999).

En suma, no sólo los RY2s sino también los RY1s podrían tener una función en la inhibición presináptica de las aferencias primarias (Ewald, 1988; Walker et al., 1988; Bleakman et al., 1991) vía inhibición de corrientes de  $Ca^{2+}$  (Silinsky, 1985; Scholz y Miller, 1992; Chen et al., 1996; McQuiston et al., 1996; Sun et al., 1998) o la activación

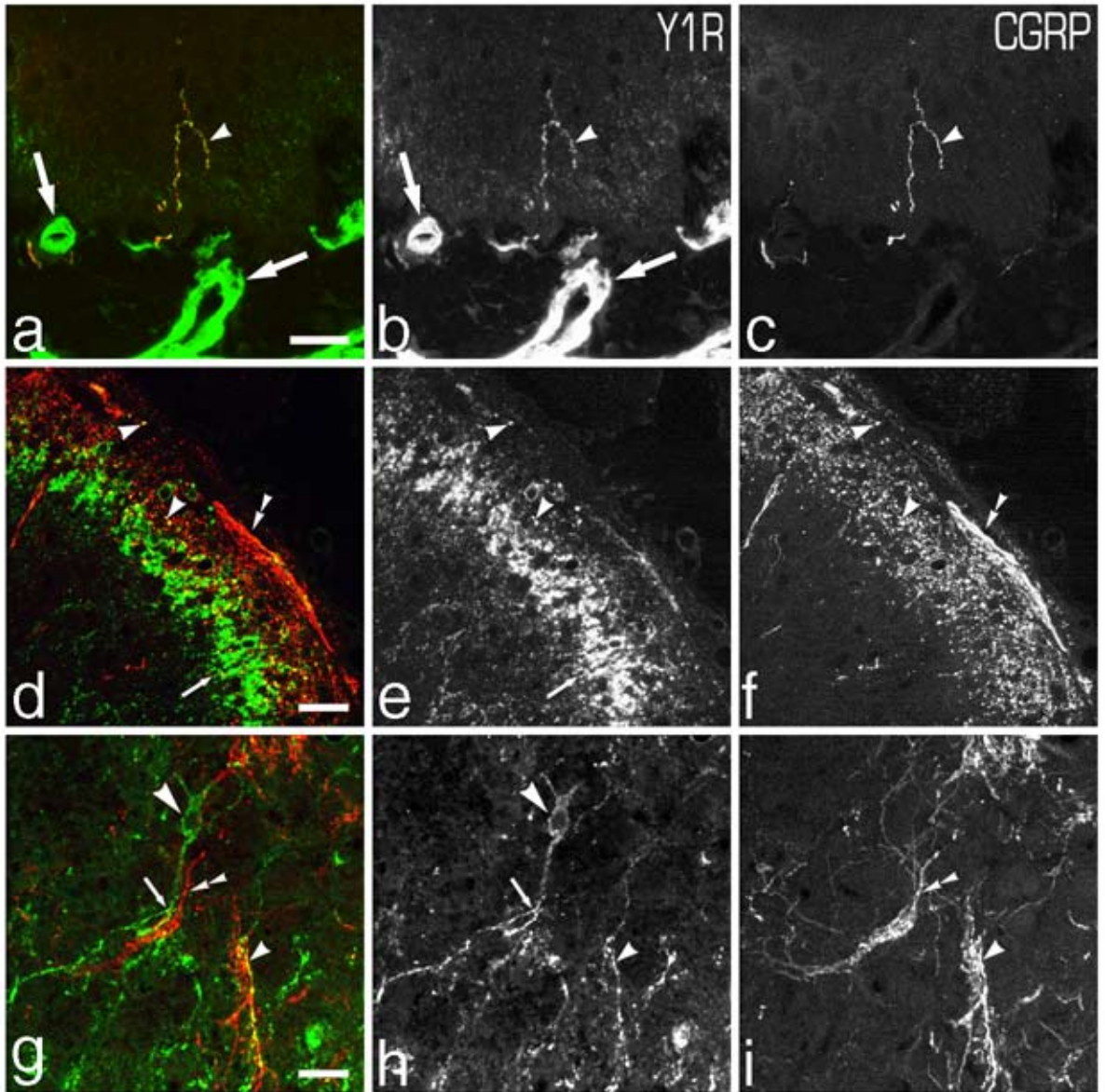
de la conductancia de  $K^+$  (Miller et al., 1990; Sun et al., 1998). De hecho, se ha propuesto que la activación de la conductancia al  $K^+$  presináptico podría resultar en un bloqueo del potencial de acción con la consiguiente reducción en la secreción en el hipocampo (Scholz y Miller, 1992). Asimismo, es posible que estos receptores sean activados en los cuerpos celulares de neuronas de los ganglios trigeminales y los GARDs (Hua et al., 1991; Mantyh et al., 1994), sugiriendo la posible acción parácrina inhibitoria del NPY al actuar sobre el RY1 (Mantyh et al., 1994; Zhang et al., 1994b; 1995d; Landry et al., 2000). Recientes estudios practicados en ratones RY1-KO indican la participación de los RY1s en dolor e inflamación neurogénica, probablemente a través de una acción presináptica del NPY sobre los RY1s (Naveilhan et al., 2001). Así, habiéndose asociado previamente al RY1 con mecanismos postsinápticos (Wahlestedt et al., 1986), también en neuronas de los GARDs (Zhang et al., 1993b), podría ser que el RY1 tuviera un rol más amplio en mecanismos periféricos.

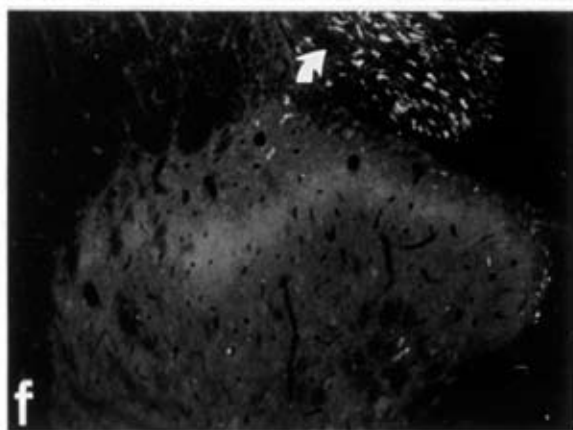
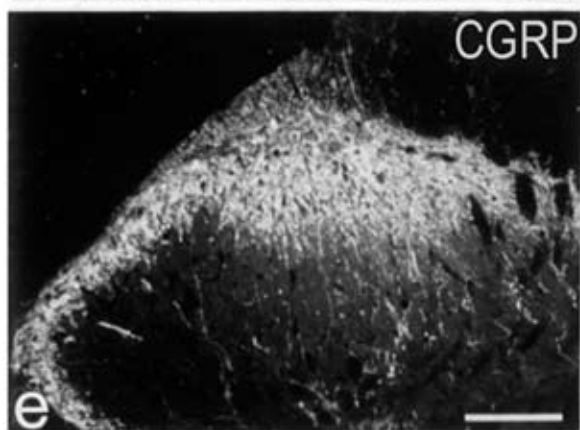
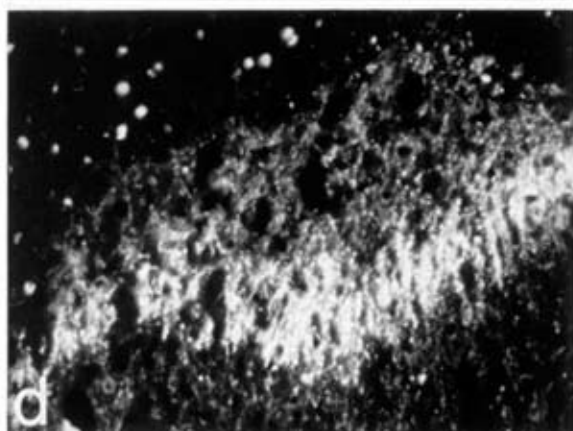
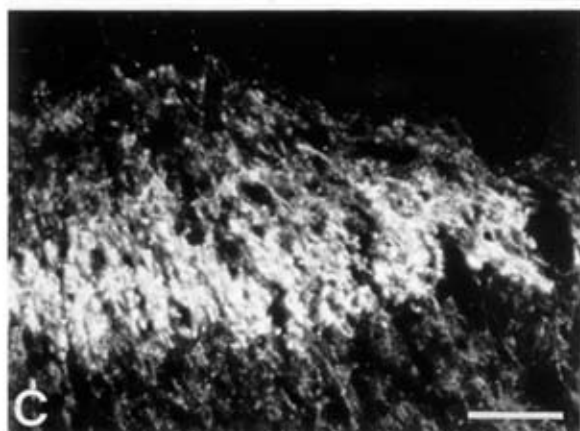
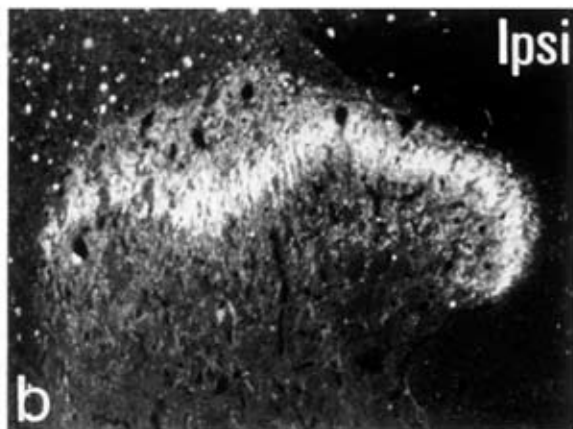
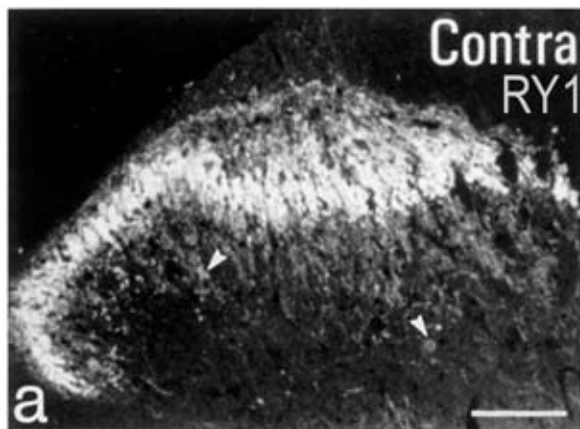






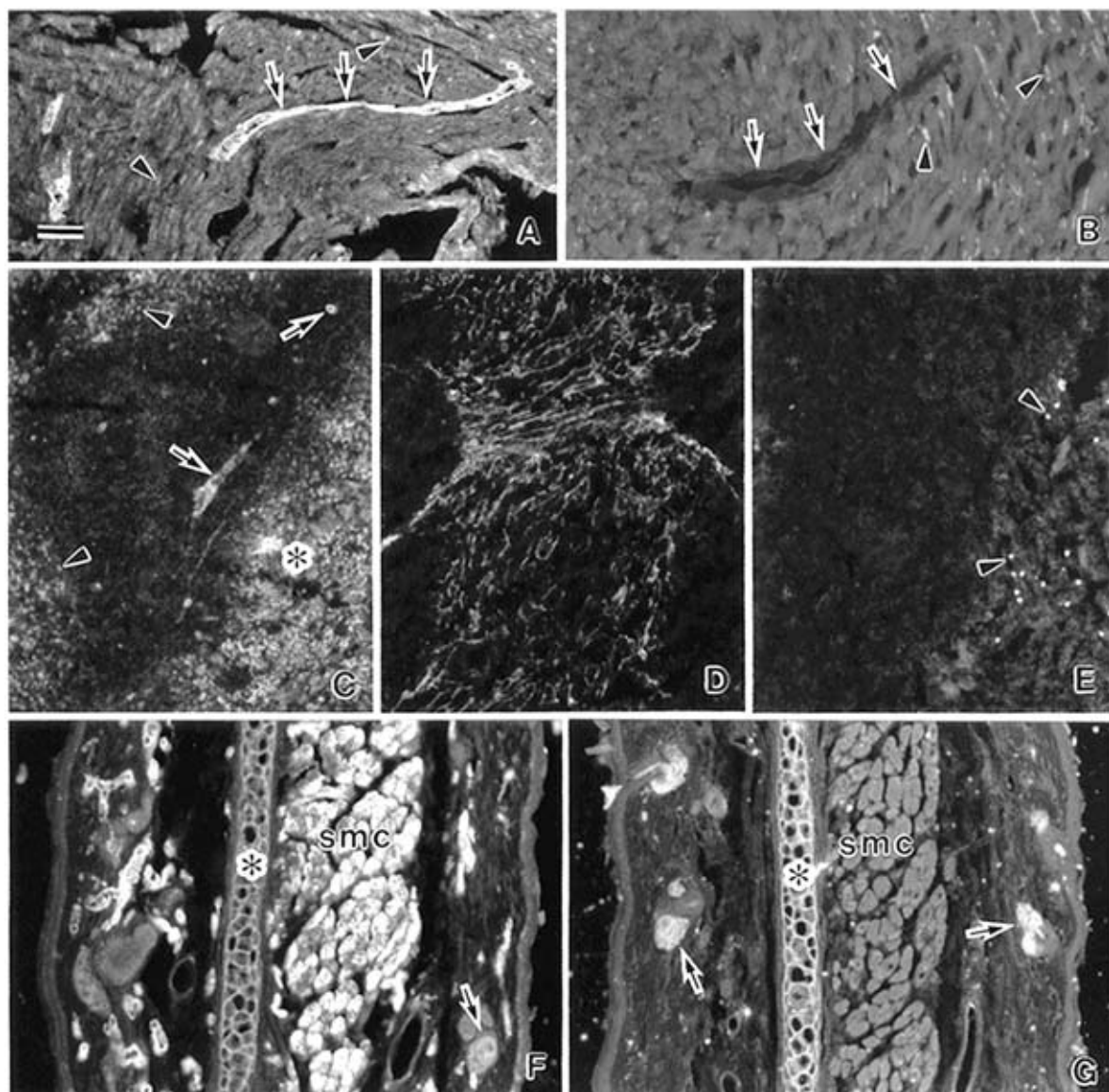


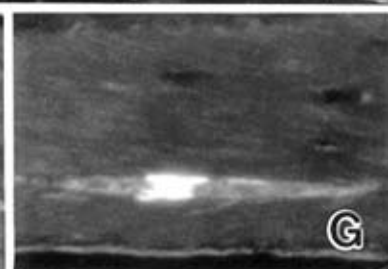
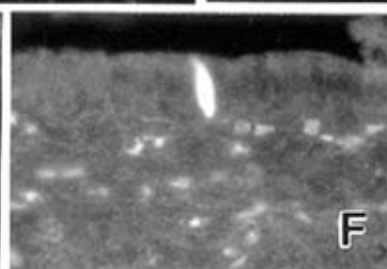
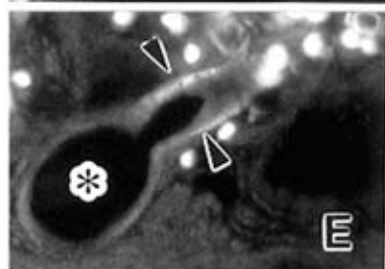
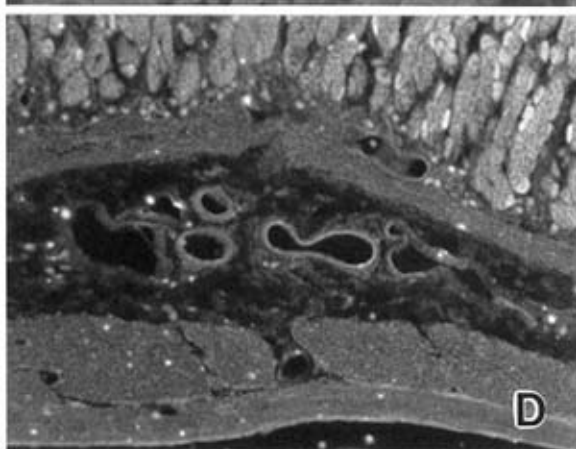
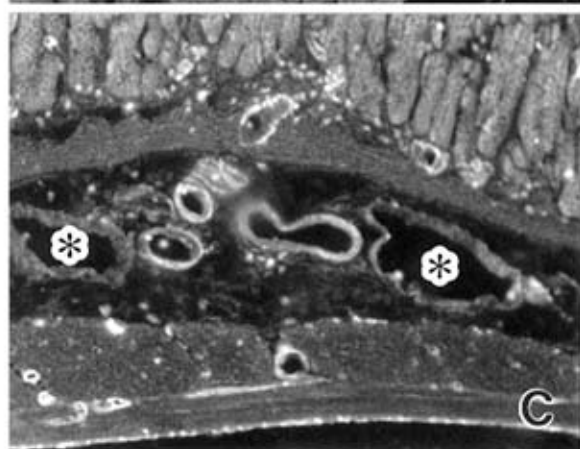
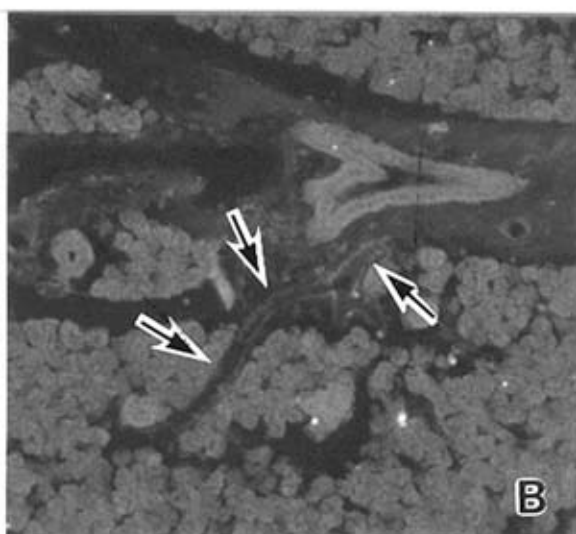
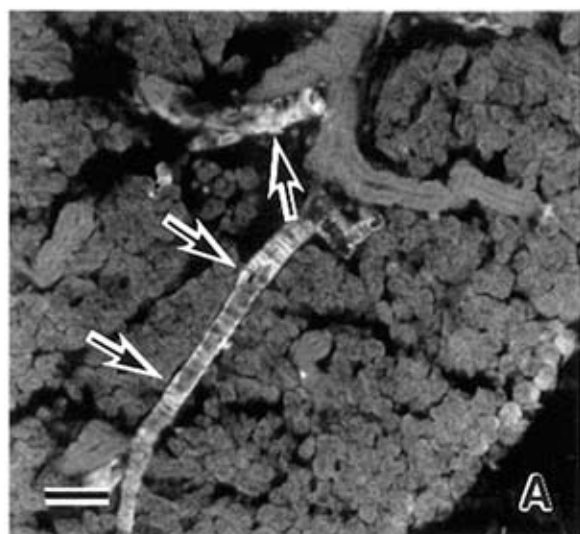




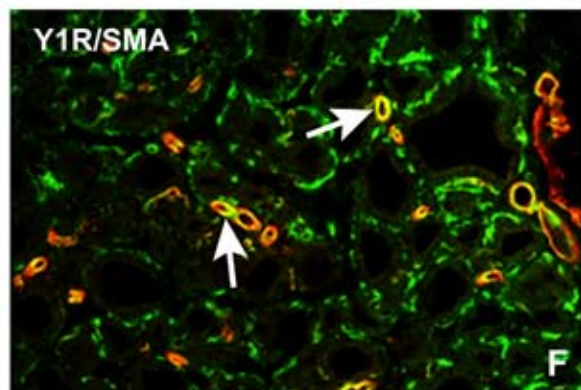
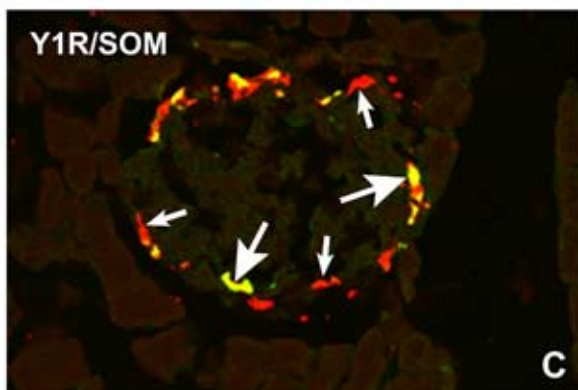
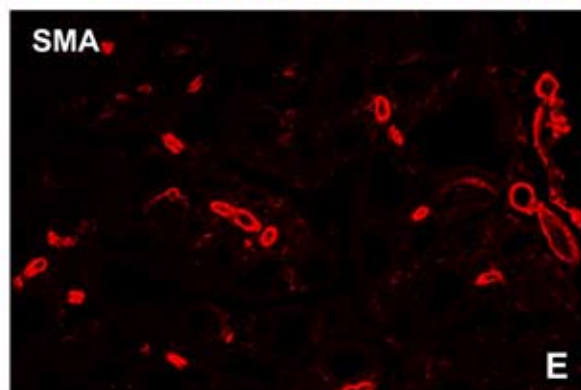
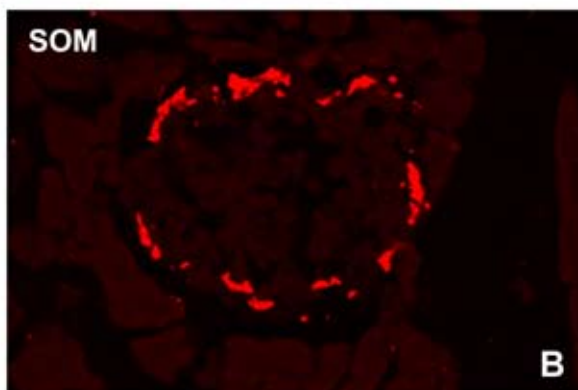
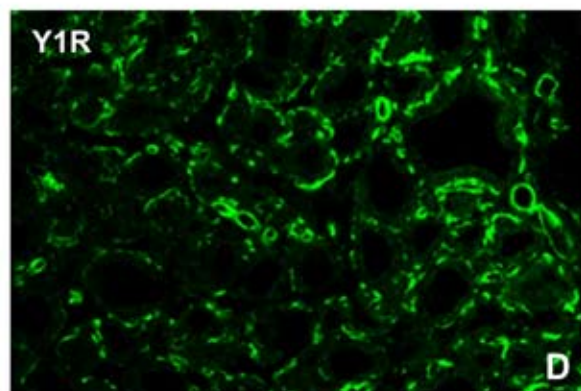
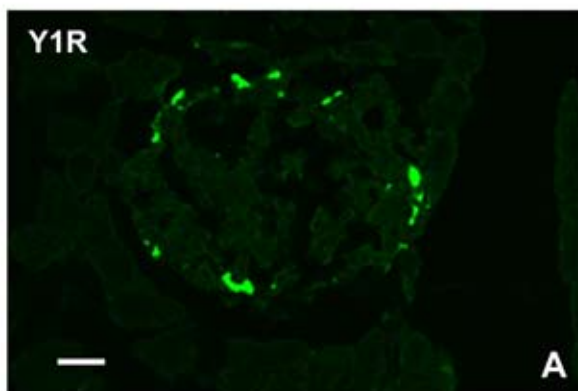
# Capítulo VIII

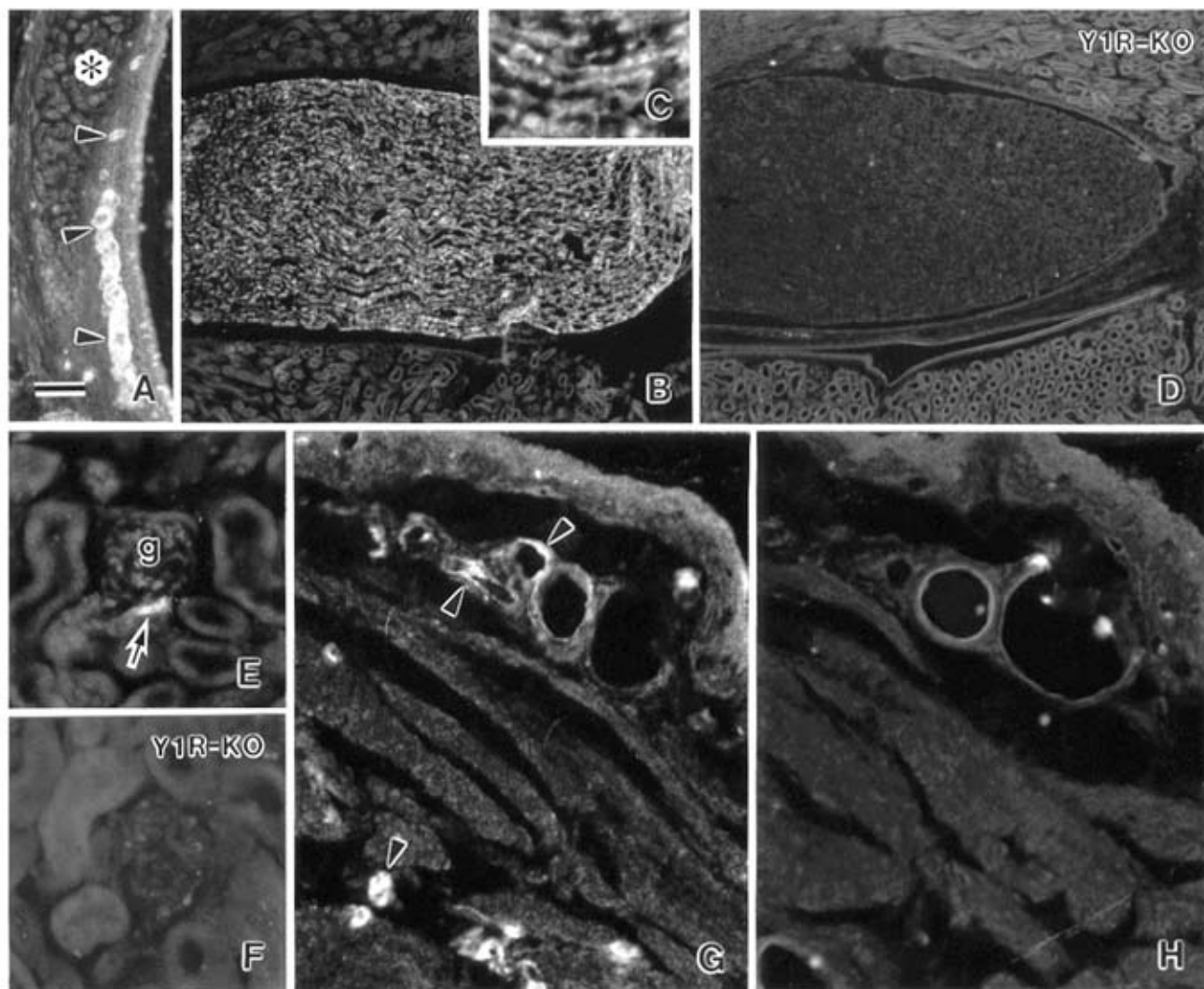
## Distribución del receptor Y1 para el Neuropéptido Y en los tejidos periféricos de roedores

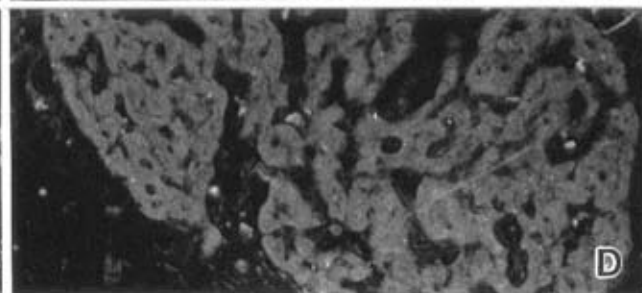
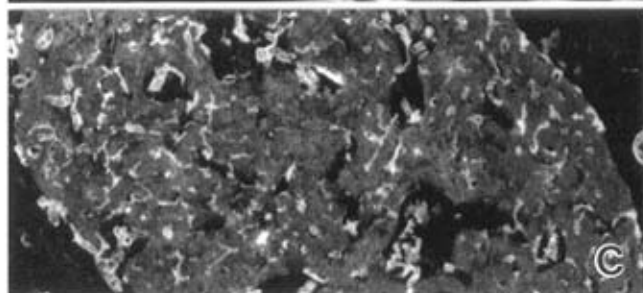
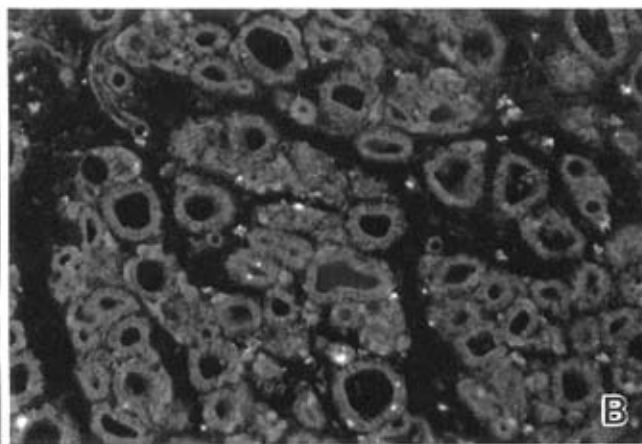
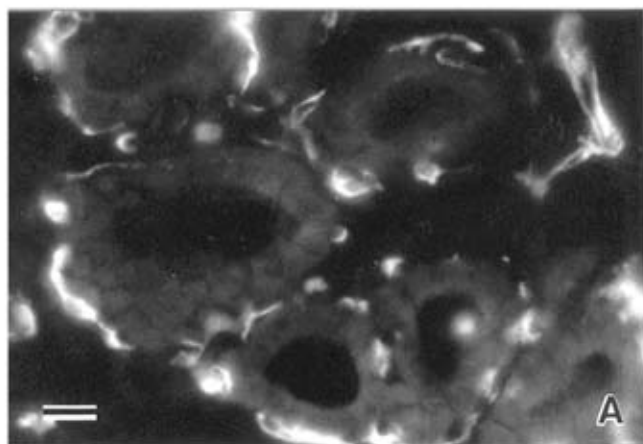




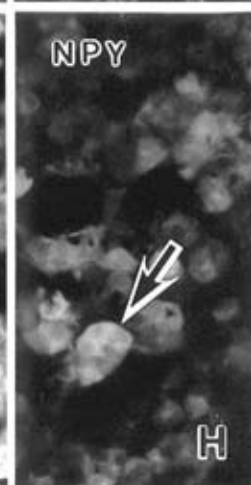
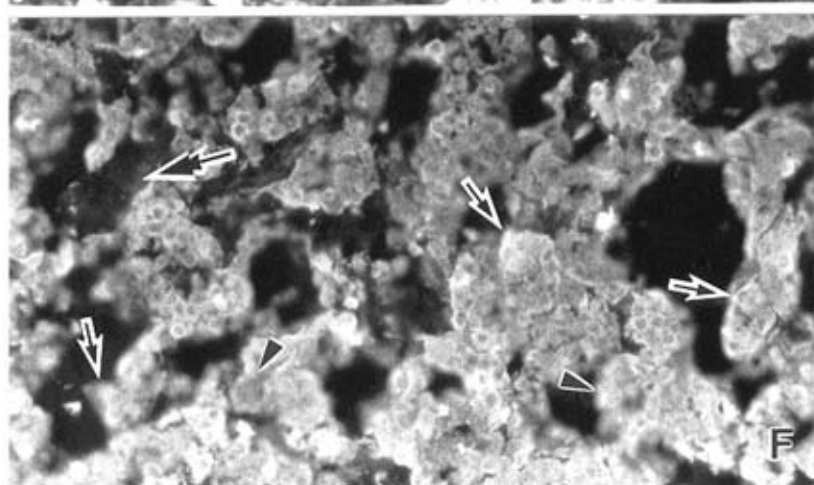
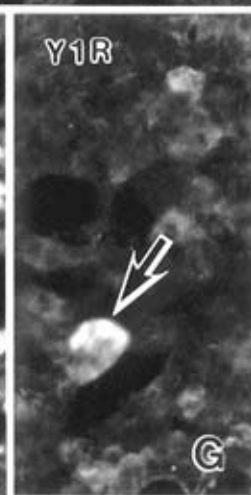
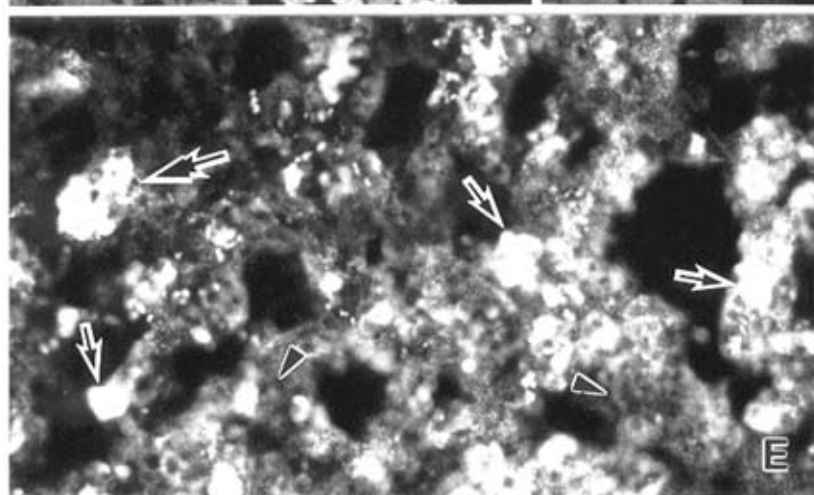
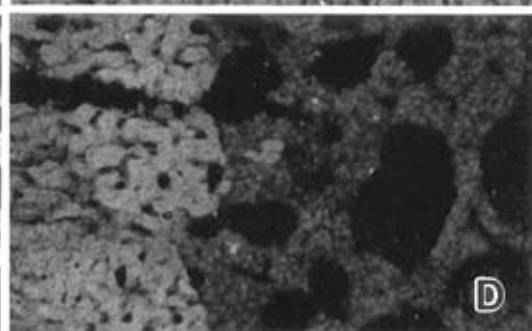
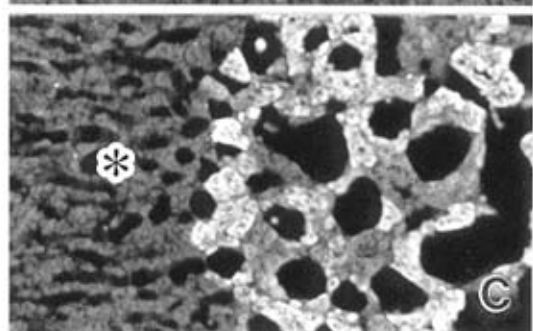
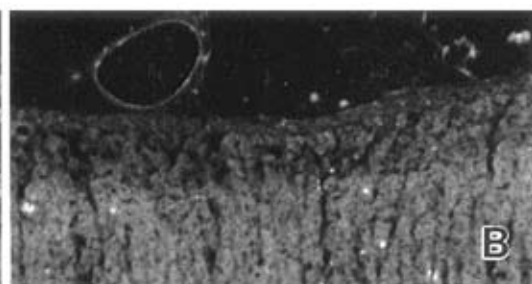
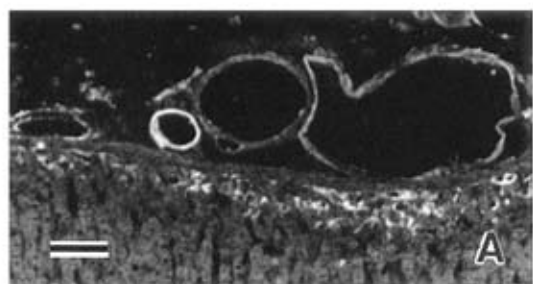


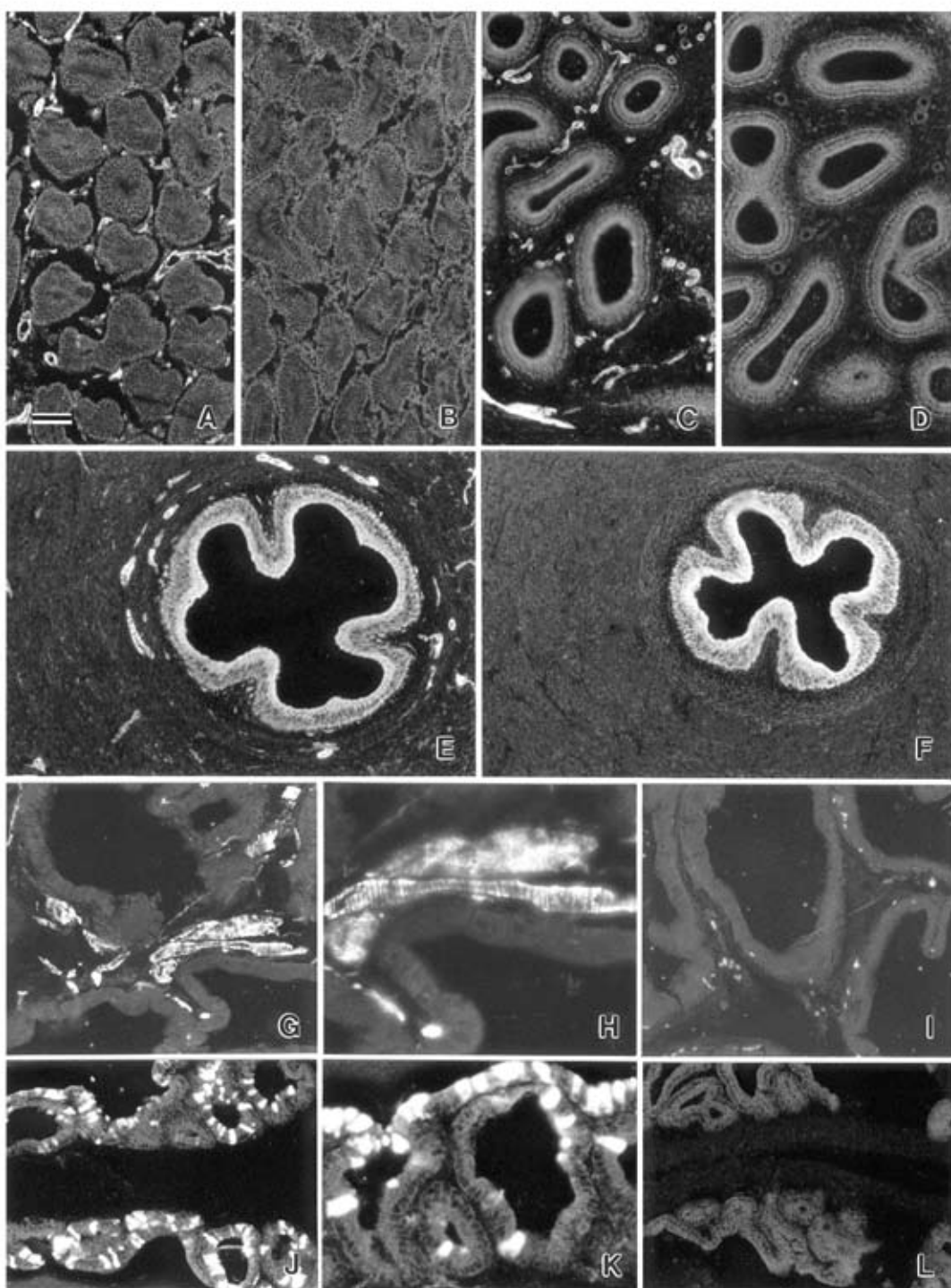


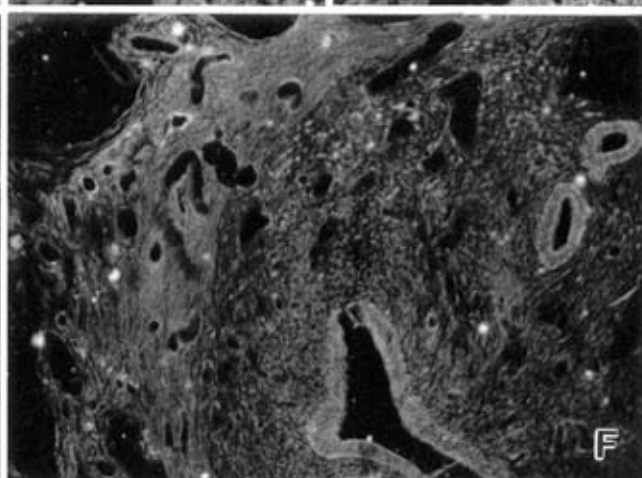
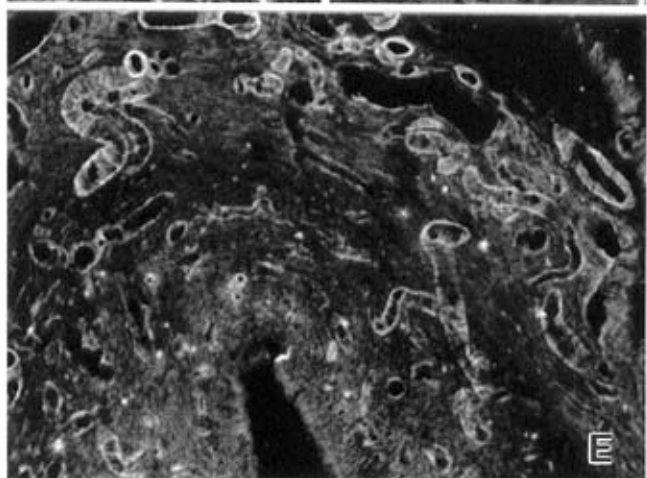
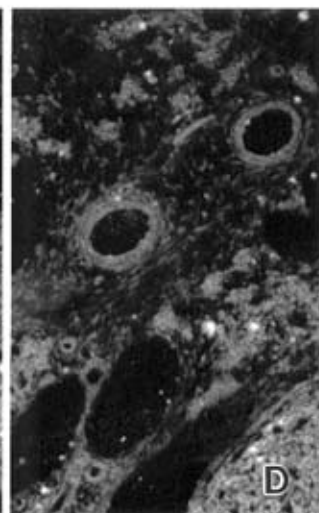
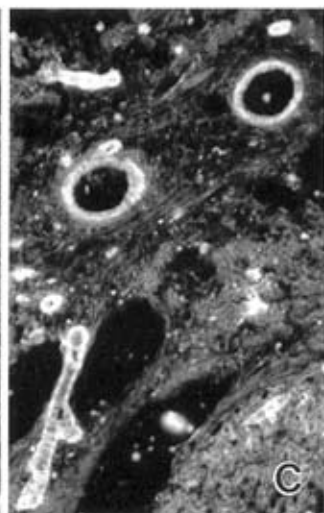
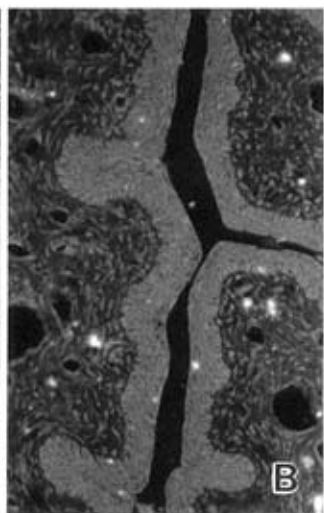
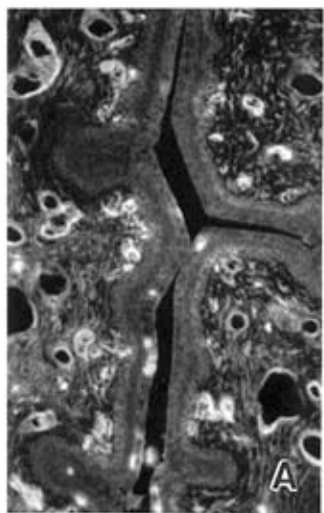












# Capítulo IX

**Caracterización inmunohistoquímica en neuronas aferentes primarias y médula espinal lumbares de ratones que sobreexpresan galanina (en neuronas que poseen el promotor de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa)**

## Introducción

El aumento en la expresión de Gal en neuronas pequeñas de los GARDs lumbares luego de la axotomía (Hökfelt et al., 1987; Villar et al., 1989) o la compresión crónica (Ma y Bisby, 1997) del nervio ciático sugieren un rol en la modulación del dolor (Liu y Hökfelt, 2002) y/o la supervivencia de las neuronas y fibras lesionadas (Kerr et al., 2000; Mahoney et al., 2003). Como ya fuera discutido en el capítulo VI de la presente tesis, la administración intratecal de Gal afecta la percepción del dolor en un modo dependiente de la condición del animal tratado (normal vs. neuropático) así como la dosis aplicada (para referencias, ver la Introducción del capítulo VI). En particular luego de la lesión nerviosa periférica, el rol preponderante de Gal es el de atenuación del dolor. Este efecto tiene su fundamento en el tipo de receptor activado (capítulo VI), lo que se sugiere también en recientes estudios electrofisiológicos e *in vitro* (Flatters et al., 2002; 2003).

Existe hoy una variedad muy importante de ratones genéticamente manipulados con el fin de bloquear o inducir la sobreexpresión de las más diversas moléculas producidas en neuronas del SNC y –P. Para Gal, se cuenta por un lado con los ratones Gal-KO (Kerr et al., 2000) y, por el otro, con diferentes cepas de ratones que sobreexpresan Gal (Gal-SE) con un patrón característico (Crawley et al., 2002; Holmberg et al., 2001; Holmes et al., 2003). En el presente capítulo trataremos acerca de la sobreexpresión de Gal en ratones en los que la copia extra fue asociada al promotor de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) (Steiner et al., 2001).

Brevemente, los ratones GalSE-PDGF-B exhiben abundante Gal en numerosas regiones del SNC y –P (Holmberg et al., 2001). En los GARDs de estos ratones, dos tercios del total de neuronas, de tamaño grande y pequeño expresan Gal (Holmberg et

al., 2001), en marcado contraste con la baja expresión del péptido en ratones Wt (Ch'ng et al., 1985; Skofitsch y Jacobowitz, 1985). Al mismo tiempo, estos ratones exhiben un modesto aumento del umbral de sensibilidad al estímulo calórico (Hygge-Blakeman et al., 2001), así como una disminución de la extravasación plasmática luego de la aplicación plantar de aceite de mostaza (Holmberg et al., 2001). Sin embargo, estos mismos ratones fueron más sensibles al dolor en el test de formalina (Holmberg et al., 2001).

Por su parte, los ratones GalSE-DBH, ligeramente más resistentes al estímulo doloroso (Fig. IX.1) mostraron un descenso más moderado en el umbral de sensibilidad mecánica y termoalgésica luego de la lesión parcial del nervio ciático, en contraste con el marcado descenso observado en ratones Wt (Fig. IX.2) (Hygge-Blakeman et al., 2003b). Sin embargo, no se observaron cambios en la capacidad regenerativa del nervio ciático luego del crush (Hygge-Blakeman et al., 2003b). Se observó además en estos ratones una reducción en la sensitización espinal inducida por el estímulo repetido de fibras de tipo C, en comparación con lo observado en ratones Wt (Grass et al., 2003).

**Fig. IX.1.** Latencias de retirada de la cola (A), y de la pata por estímulo calórico radiante (B) y umbral de retirada de la pata por estímulo mecánico (C) en ratones GalSE (columnas grises) y Wt control (columnas abiertas). Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM en A y B y como mediana  $\pm$  desviación absoluta de la mediana (MAD) en C y el número de ratones testeado se indica entre paréntesis debajo de las columnas. \* =  $P < 0.05$  comparado con el ratón Wt usando el t-test no pareado (tomado de Hygge-Blakeman et al., 2003b).

**Fig. IX.1.** Tail flick latency (A), paw withdrawal latency to radiant heat stimulation (B) and paw withdrawal threshold to mechanical stimulation (C) in GAL-OE mice (black columns) and wild-type controls (open columns). The data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. in A and B and as median  $\pm$  median absolute deviation (MAD) in C and the number of mice tested is indicated in the brackets under the columns. \* =  $p < 0.05$  compared to wild-type mice with unpaired t-test (taken from Hygge-Blakeman et al., 2003b).

**Fig. IX.2.** Umbral de retirada de la pata por estímulo mecánico (A) y latencia de retirada de la pata por estímulo calórico radiante (B) antes y después de la lesión fotoquímica del nervio ciático en ratones GalSE (cuadrados negros, n=20) y Wt control (cuadrados abiertos, n=10). Los datos se expresan como mediana  $\pm$  MAD en A y como promedio  $\pm$  SEM en B. **A:** \* =  $P < 0.05$  y \*\* =  $P < 0.01$  comparado con los ratones Wt usando el test de Mann-Whitney y † =  $P < 0.05$  y †† =  $P < 0.01$  comparado con los valores control usando el test de Wilcoxon. **B:** ANOVA mostró que hay una diferencia significativa entre los ratones GalSE y Wt control. \* =  $P < 0.05$  o \*\* =  $P < 0.01$  comparado con los ratones salvajes usando el t-test no pareado y † =  $P < 0.05$  o †† =  $P < 0.01$  comparado con los valores control usando el test de Fisher PLSD luego de ANOVA (tomado de Hygge-Blakeman et al., 2003b).

**Fig. IX.2.** Paw withdrawal threshold to mechanical stimulation (A) and Paw withdrawal latency to radiant heat stimulation (B) before and after photochemically-induced sciatic nerve injury in GAL-OE (filled squares, n=20) and wild-type controls (open squares, n=10). The data are expressed as median  $\pm$  MAD in A, and as mean  $\pm$  S.E.M in B. **A:** \* =  $p < 0.05$  and \*\* =  $p < 0.01$  compared to wild-types with Mann-Whitney U-test and † =  $p < 0.05$  and †† =  $p < 0.01$  compared to control value with Wilcoxon signed-ranks test. **B:** ANOVA with repeated measures showed that there is an overall significant difference between GAL-OE mice and wild-type controls. \* =  $p < 0.05$  and \*\* =  $p < 0.01$  compared to wild-types with unpaired t-test and † =  $p < 0.05$  and †† =  $p < 0.01$  compared to control value with Fisher PLSD test following ANOVA (taken from Hygge-Blakeman et al., 2003b).



## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratones macho GalSE-DBH (15) y Wt de la misma camada (13), con un peso de entre 20-30 g, provistos por los Laboratorios Jackson (Jackson Laboratories, USA). Además, fueron incluidos en el estudio 9 ratones Wt C57/Bl6 utilizados para las cruces de los animales transgénicos. Todos estos animales fueron mantenidos en un ciclo día/noche de 12hs cada uno, con agua y comida *ad libitum*.

Las lesiones practicadas fueron aprobadas por el comité éticos sueco (Stockholms Norra Djurförsöksetiska Namd) (#206/99).

### **Axotomía**

Se practicó la sección completa unilateral del nervio ciático en ratones GalSE (8) y Wt (8) previamente anestesiados con una mezcla de Hypnorm (Fentanyl/Fluanison) y Dormicum (Midazolam), diluídos en suero salino normal, inyectada por la vía i.p (7-10 ml/kg). El abordaje, sección y cierre de la lesión en la piel fueron practicados del mismo modo que se detallara en los capítulos V y VI en ratas.

### **Inmunohistoquímica**

**Preparación del tejido.** Después de 7 días de axotomía (8 GalSE; 8 Wt) e incluyendo 16 ratones no lesionados (7 GalOE; 5 Wt; 4 C57Bl/6), todos los animales fueron profundamente anestesiados usando pentobarbital sódico (60 mg/Kg) i.p. y perfundidos con 20 ml de buffer tirode (37°C), seguido de 20 ml de una mezcla de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0.2% en buffer fosfato 0.16 M (pH 6.9) (Pease, 1962; Zamboni y De Martino, 1967) y 50 ml de la misma solución a 4°C en aproximadamente 5-7 min. Posteriormente, fueron disecados el GARD L5 y la región

plantar de la pata posterior contra- e ipsilaterales, el segmento lumbar L4-5 de la médula espinal, y los ganglios simpáticos supracervicales (GSS), todo lo cual fue postfijado en el mismo fijador por 90 min a 4°C, y finalmente sumergido en sacarosa al 10% diluída en PBS (pH 7.4) conteniendo azida sódica 0.01% (Sigma, St. Louis, MO, USA) y Bacitracina al 0.02% (Sigma) (4°C) por al menos 48 hs. Todos los tejidos fueron incluídos en OCT y seccionados usando un crióstato (Microm, Heidelberg, Alemania) a 14 µm para los GARDs, los GSS y la piel, y a 20 µm para las médulas espinales, y montados en portaobjetos previamente gelatinizados con alumbre de cromo y gelatina.

**Protocolo de incubación.** Las secciones fueron incubadas entre 24-48 hs a 4°C con un anticuerpo de conejo dirigido contra galanina (diluído 1:4000) (Theodorsson y Rugarn, 2000). Para visualizar el producto de la inmunoreactividad, las secciones fueron procesadas usando un kit comercial (TSA Plus, NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA). Para detalles de la técnica, referirse al capítulo VI. Al terminar con esta técnica, todas las secciones destinadas a cuantificación fueron incubadas por 3 min en Ioduro de Propidio (Sigma) al 0.001%, seguido de tres lavados en PBS.

Algunas secciones fueron procesadas con un segundo anticuerpo primario para análisis de colocalización. En tal caso, primero se procedió a la incubación con el anticuerpo contra galanina como se indicó más arriba, y luego de dos lavados en PBS a TA, se incubaron con un anticuerpo de conejillo de indias contra CGRP (1:400; Península), de oveja contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (1:400) o de conejillo de indias contra serotonina (5HT) por otras 24-48 horas. Al finalizar los pasos de incubación con los anticuerpos primarios, se procesó primero el anticuerpo contra Gal usando el kit TSA plus (ver párrafo anterior), y luego del último lavado con TNT, se hicieron dos lavados en PBS antes de continuar con la técnica de fluorescencia indirecta, usando anticuerpos de burro anti-conejillo de indias ó anti-oveja conjugados

respectivamente con Rodamina Roja X ó Cy3 (1:40; 1:400, respectivamente; Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA). Finalmente, las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos y una solución de DABCO en glicerol al 2.5% (Sigma).

Las secciones fueron examinadas usando un microscopio Nikon Microphot-FX equipado con un filtro Nikon B-1E (excitación de  $480 \pm 10$  nm con un filtro de emisión de 520-550 nm) para la visualización de la fluorescencia producida por FITC (galanin), o un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 provisto de una cámara fija digital Nikon DXM1200 (Tokyo, Japón). Las fotografías fueron tomadas en un film Kodak T-400, las cuales fueron digitalizadas usando un scanner Nikon Scanner LS-2000 (Tokyo, Japón), o usando la cámara digital Nikon DXM 1200. Por otro lado, se obtuvieron imágenes de colocalización de diferentes marcadores fluorescentes usando un microscopio de escaneado confocal Bio-Rad Radiance Plus (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) instalado en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 equipado con objetivos 10 x/0.45 N.A. y 20 x/0.75 N.A. La fluoresceína fue excitada usando la línea de 488 nm del láser de ion argón y su señal detectada usando un filtro de emisión HQ 530/60 (Bio-Rad). Para la detección de la señal de la rodamina roja-X, se usó la línea de 543 nm del láser verde HeNe en combinación con el filtro de emisión HQ 590/70 (Bio-Rad).

**Controles.** Algunas secciones fueron incubadas únicamente con uno de los anticuerpos precitados (Gal (conejo), CGRP (conejillo de indias), TH (oveja), 5HT (conejillo de indias)) y procesados por TSA o fluorescencia normal para certificar el patrón de inmunoreactividad y compararlo con el obtenido luego de los estudios de doble tinción.

### **Hibridación *in situ***

Se utilizó una sonda complementaria para los nucleótidos 152-199 del ARNm de Gal (Vrontakis et al., 1987), marcada con  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -dATP (New England Nuclear, Boston, MA, USA) en el extremo 3', usando la enzima deoxynucleotidyltransferasa (Amersham, UK) y purificada usando microcolumnas de purificación ProbeQuant G50 (Amersham, UK). La actividad específica de las sondas marcadas fue de  $1\text{-}4 \times 10^6$  cpm/ng de sonda.

Se utilizaron 5 ratones GalSE y 5 Wt pertenecientes a la misma camada (3 Axo; 2 no lesionados para cada grupo) así como 5 ratones C57/B16 regulares no lesionados, todos los cuales fueron sacrificados por decapitación. Los GARDs L5 contra- e ipsilateral a la lesión más los GSS fueron rápidamente disecados y congelados en hielo seco. Posteriormente, los tejidos fueron cortados a  $14 \mu\text{m}$  y montados en portaobjetos ProbeOn (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Las secciones a hibridizar fueron secadas a TA en una campana de extracción durante una noche y luego incubadas con la sonda respectiva (0.5 ng) por 16-18 h a  $42^\circ\text{C}$ , siguiendo el protocolo indicado en el capítulo II de Materiales y Métodos en la presente tesis (págs. 33-35).

Después de la hibridación, las secciones fueron lavadas con SSC 1X a  $55^\circ\text{C}$ , cuatro veces de 15 min, seguido de un lavado de 1h a TA, rápidamente deshidratadas y secadas a TA en la campana de extracción. Los portaobjetos fueron sumergidos luego en la emulsión fotográfica líquida NTB2 (Kodak, Rochester, NY, USA). Cumplido el tiempo de exposición apropiado (2 a 4 semanas), las secciones fueron reveladas usando la solución Kodak D19 y fijadas con el fijador Kodak 3000. Estos portaobjetos fueron montados con cubreobjetos usando glicerol y observados al microscopio para su análisis en campo oscuro. En un paso posterior, y en caso de ser necesario, las secciones fueron desmontadas y contrateñidas con azul de toluidina para ser re-montadas con

cubreobjetos usando Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey, U.S.A) para su posterior visualización por campo claro.

**Controles.** Algunas secciones de todos los tejidos analizados fueron incubadas con una mezcla de sonda radioactiva y no-radioactiva (esta última a una concentración 100 veces mayor).

Las secciones fueron examinadas usando un microscopio Nikon Eclipse E800 equipado con un condensador de campo oscuro e iluminación de epi-polarización. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon DN-100 montada al microscopio Nikon Eclipse.

### **Procesado digital de las imágenes**

La resolución, brillo y contraste de todas las imágenes fueron optimizadas usando el programa Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) e impresas con una impresora Epson Stylus Photo EX (Seiko Epson Corp., Nagano, Japón). Las imágenes no fueron modificadas en ninguno de sus detalles.

### **Cuantificación**

La cuantificación se llevó a cabo en los ganglios de ratones GalSE y Wt procesados por inmunohistoquímica tanto de ratones control como lesionados (axotomía).

El porcentaje de PNs Gal-IR fue determinado en los GARDs L5 después de 7 días de sobrevida a la lesión del nervio ciático, así como en animales control. En cada tercera sección de los GARDs, se practicó el conteo de PNs Gal-IR exhibiendo el perfil nuclear, así como el número total de PNs presentes en la misma sección teñida con Ioduro de Propidio (0,001%; Sigma), el cual tiñe ácidos nucleicos, dando un patrón de

inmunofluorescencia similar a la tinción de Nissl, destacándose un núcleo fluorescente. En total, se cuantificaron de 8 a 10 secciones por cada ganglio.

Para la estimación semicuantitativa de los tamaños celulares se utilizó una grilla cuadrículada aplicable a los oculares del microscopio, con un tamaño proyectado por cuadrado de  $40 \times 40 \mu\text{m}$  ( $1600 \mu\text{m}^2$ ). De este modo, se procedió a la separación de los distintos tamaños celulares en dos grupos principales: 1) neuronas pequeñas, que ocuparan un cuarto de área de un cuadrado ( $400 \mu\text{m}^2$ ), y 2) neuronas grandes y medianas, que ocuparan dos o más cuartos de área ( $800 - > 1600 \mu\text{m}^2$ ).

### **Estadística**

Todos los experimentos fueron conducidos a ciegas respecto del genotipo de los ratones. La información en los gráficos está expresada como promedio  $\pm$  SEM, y fue analizada usando ANOVA con mediciones repetidas, seguido del t-test pareado, para la comparación entre los lados contra- e ipsilateral dentro de un mismo grupo, y con el t-test no pareado para comparar los ratones transgénicos con los Wt o el efecto de lesiones del nervio ciático entre lados ipsilaterales.

## **Resultados**

### Ratones no lesionados

#### ***GARDs y ganglios supracervicales***

En neuronas aferentes primarias del GARD L5 de los ratones GalSE se observó un número importante de PNs Gal-IR, con numerosas neuronas pequeñas y varias neuronas de tamaño grande (Figs. IX.3a, b, e, f). Por su parte, los ratones Wt mostraron un número considerablemente menor de PNs positivos para Gal, y virtualmente todos correspondientes a la subpoblación de neuronas pequeñas (Fig. IX.3c, d).

Ocasionalmente, se detectaron fibras perivasculares Gal-IR en ambos tipos de ratón (Fig. IX.3a, c). Los experimentos de doble tinción mostraron que un 66% de las neuronas Gal-IR en ratones GalSE expresan también CGRP, comparado con el 91% observado en ratones Wt (Figs. IX.4a, b, c; 5). Tanto en ratones GalSE como Wt, la coexistencia fue marcada en neuronas pequeñas (74% y 91%, respectivamente), mientras que sólo un número reducido de PNs Gal-IR de tamaño grande exhibieron doble tinción con CGRP en los ratones GalSE (Figs. IX.5). Tanto en ratones GalSE como en los Wt, se pudo observar, especialmente en neuronas de tamaño grande, gránulos de lipofucsina autofluorescentes (Fig. IX.4 d). Por otro lado, la expresión de TH estuvo casi totalmente restringida a un subgrupo de neuronas pequeñas de los GARDs (Figs. IX. 6a, b), con un mínimo porcentaje de coexpresión con Gal observado en algunas neuronas pequeñas de los ratones GalSE (Figs. IX.5; 6c). Asimismo, se observó el ingreso de fibras nerviosas simpáticas a la proyección axonal periférica de los GARDs, fuertemente Gal- y TH-IR (Fig. IX.5d). En su gran mayoría, estas fibras se dirigieron inmediatamente hacia la periferia, y muy pocas fibras se introdujeron en el ganglio (información no mostrada).

Los ratones GalSE exhibieron una muy intensa inmunoreactividad para Gal en los ganglios simpáticos supracervicales en gran cantidad de PNs TH-IR (Fig. IX.6e). Por su parte, la expresión de Gal en ratones Wt fue más moderada y en su mayoría presente en neuronas positivas para TH (Fig. IX.6f).

Por su parte, los estudios de hibridación *in situ* confirmaron lo observado por inmunohistoquímica, con varios PNs grandes y algunos pequeños ARNm-Gal-positivos en los GARDs L5 de ratones GalSE no lesionados (Fig. IX.7a, c, d). En los ganglios de los ratones Wt sólo ocasionalmente se observaron neuronas pequeñas Gal-positivas (Fig. IX.7b). En los ganglios supracervicales, la intensidad de marcación así como el

número de perfiles neuronales Gal-positivos fue sensiblemente mayor en los ratones GalSE respecto de los ratones Wt (Fig. IX.7f, g). La incubación con la sonda control mostró desaparición completa de la hibridización en neuronas de los GSS de ratones GalSE (Fig. IX.7e).

#### *Piel del aspecto plantar de la pata posterior*

En la piel plantar de los ratones GalSE pudo observarse un gran número de perfiles fibrosos Gal-IR, en las glándulas sudoríparas (Fig. IX.8a, b), así como alrededor de vasos sanguíneos y fascículos fibrosos dérmicos (Fig. IX.8d). Algunas fibras Gal-IR también fueron observadas cerca de la lámina basal en el límite entre dermis y epidermis (Fig. IX.8a). En contraste, la expresión de Gal en los ratones Wt fue sólo observada en fascículos fibrosos dérmicos y sub- o intraepidérmicos (Fig. IX.7c) y alrededor de vasos sanguíneos (Fig. IX.7e).

#### Axotomía del nervio ciático

##### ***GARDs L5***

La axotomía del nervio ciático indujo un intenso aumento en la expresión de PNs Gal-IR, tanto en ratones Wt como GalSE (Figs. IX.9a, 10a-d). El aumento fue muy marcado en la población de neuronas pequeñas en ambos tipos de ratón (Fig. IX.9b; 10b, d). Por su parte, los ratones Wt exhibieron un incremento de aproximadamente 5% en el número de PNs grandes Gal-IR, mientras que los ratones GalSE exhibieron un aumento moderado en el porcentaje ya elevado de PNs grandes (de 5 a 7.5% aproximadamente) (Fig. IX.9c; 10b, d).



Asta dorsal de la médula espinal

La expresión de Gal en las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal en el lado contralateral (Fig. IX.11. a, c) o en animales control (resultados no mostrados) fue similar entre ratones Wt y GalSE. La axotomía del nervio ciático indujo un aumento dramático en la expresión de Gal en procesos fibrosos en láminas profundas (III-V) del asta dorsal de la médula espinal en ambas clases de ratón (Fig. IX.11b, d).

Además, en los ratones GalSE se observó una inmunoreactividad más marcada en procesos fibrosos probablemente relacionados con sistemas descendentes, en comparación con los ratones Wt (Fig. VII.12a-d). Los estudios de colocación mostraron que en su gran mayoría estas fibras son 5-HT negativas en ambos tipos de ratón (Fig. VII.12e, f).

**Fig. VII. 3.** Microfotografías de fluorescencia óptica (A-D) y confocal (E, F) mostrando los GARDs de ratones GalSE (A, B, E, F) y Wt (C, D) luego de la incubación con el anticuerpo contra Gal. Nótese los numerosos PNs pequeños (cabezas de flecha) y grandes (cabezas de flecha doble) presentes en ratones GalSE (A, B, E, F) mientras que sólo se observan PNs pequeños (cabezas de flecha) en ratones Wt (C, D). Las flechas indican fibras Gal-IR de posible origen simpático. Barras de calibración: 100  $\mu\text{m}$  en D (aplica a A, C); 50  $\mu\text{m}$  en D (aplica a B, D); 10  $\mu\text{m}$  para (E, F).

**Fig. VII. 3.** Immunofluorescence optic (A-D) and confocal (E, F) micrographs of DRGs of GAL-OE (A, B, E, F) and Wt (C, D) mice after incubation with galanin antiserum. Note numerous small (arrowheads) and large (double arrowheads) NPs present in GAL-OE mice (A, B, E, F) and only small ones (arrowheads) in the Wt (C, D). Arrows point to galanin-positive fibers of possible sympathetic origin. Calibration bars: 100  $\mu\text{m}$  in D (applies to A, C); 50  $\mu\text{m}$  in D (applies to B, C); 10  $\mu\text{m}$  for (E, F).

**Fig. IX. 4.** Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando los GARDs de ratones GalSE (A, C, D) y Wt (B) luego de la incubación con los anticuerpos contra Gal y CGRP. Notar la abundante colocalización de Gal y CGRP en neuronas pequeñas (flechas pequeñas) en los ratones Wt (B) y transgénicos (A, C). En D, se observan gránulos de lipofucsina autofluorescentes, especialmente en neuronas grandes (cabezas de flecha pequeñas). Barras de calibración: 50  $\mu\text{m}$  in D (aplica a A, B); 10  $\mu\text{m}$  para (C, D).

**Fig. IX. 4.** Double-staining immunofluorescence micrographs of DRGs of GAL-OE (A, C, D) and Wt (B) mouse after incubation with Gal and CGRP antiserum. Note the abundant colocalization of Gal and CGRP (small arrows) in small neurons in Wt (B) and transgenic mice (A, C). In D, several lipofuscin granules can be seen, especially in large neurons (small arrowheads). Calibration bars: 50  $\mu\text{m}$  in D (applies to A, B); 10  $\mu\text{m}$  for (C, D).

**Fig. IX.5.** Gráficos (A, B) y tabla (C) mostrando el porcentaje de co-expresión de CGRP en PNs Gal-IR (A, C), Gal en PNs CGRP-IR (B, C), o de Gal y TH (C) en los GARDs de ratones GalSE (n = 6) y Wt (n = 4). Entre paréntesis en C se indica el número de PNs contados para el marcador correspondiente.

**Fig. IX.5.** Graphs (A, B) and table (C) showing the percentage of co-expression of CGRP in Gal-IR NPs (A, C), Gal in NPs CGRP-IR (B, C), or Gal and TH (C) in DRGs of GalOE (n = 6) and Wt (n = 4) mice. Between brackets in C the number of counted NPs for a corresponding marker is indicated.

**Fig. IX.6.** Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando los GARDs (A-D) y GSS (E, F) de ratones GalSE (A, C, D, E) y Wt (B, F) luego de la incubación con los anticuerpos contra Gal y TH. Se observa la expresión de TH en una subpoblación de neuronas pequeñas (cabezas de flecha), tanto en ratones GalSE (A, C) como Wt (B). En pocas oportunidades pudo observarse colocalización de TH y Gal en ratones GalSE (C; flecha pequeña), inexistente en ratones Wt (B). En D, se muestra un componente fibroso Gal/TH-IR de probable origen simpático. En el GSS, se observaron numerosos PNs Gal/TH-IR en ratones GalSE (E), mientras que ratones Wt exhibieron una abundante inmunoreactividad para TH, pero con PNs Gal-IR dispersos (F). Barras de calibración: 50  $\mu\text{m}$  para (A-D); 100  $\mu\text{m}$  en F (aplica a (E, F)).

**Fig. IX. 6.** Confocal immunofluorescence micrographs of DRGs (A-D) and SCG (E, F) of GalOE (A, C, D, E) and Wt (B, F) mice after incubation with Gal and TH antisera. The expression of TH is observed in a subpopulation of small neurons (arrowheads), in GalOE (A, C) and Wt (B) mice. Scattered Gal/TH-IR NPs (small arrow) can be observed in the GalOE mice (C), but never in the Wt mice (B). In D, a Gal/TH-IR nerve bundle of probable sympathetic origin is shown. In the SCG, several Gal/TH-IR NPs can be seen in GalOE mice (E), whereas Wt mice exhibit an abundant immunoreactivity for TH, with a few scattered Gal-IR NPs (F). Calibration bar: 50  $\mu\text{m}$  for (A-C); 100  $\mu\text{m}$  in F (applies to (E, F)).

**Fig. IX. 7.** Microfotografías de campo oscuro (A, B, E, F, G) y claro (C, D) mostrando la expresión del ARNm de Gal en los GARDs (A-D) y el GSS (E-G) de ratones GalSE (A, C-F) y Wt (B, G). Varios PNs Gal-positivos pueden verse en los GARDs de los ratones GalSE (A), pertenecientes a las subpoblaciones de neuronas de tamaño pequeño (cabezas de flecha) y grande (cabezas de flecha doble) (A, C, D). En comparación, sólo se observaron unos pocos PNs pequeños Gal-positivos en los ratones Wt (B). En el GSS, se observa una extremadamente abundante expresión de Gal en los ratones transgénicos (F), siendo esta mucho menor en los ratones Wt (G). Se observa la desaparición completa de la señal de Gal en una sección del GSS de un ratón GalSE, luego de la incubación con una mezcla de sonda marcada y no marcada, usado como control de la técnica de hibridización *in situ* (E). Barras de calibración: 100  $\mu\text{m}$  en G (aplica a A, B, E, F, G); 25  $\mu\text{m}$  para (C, D).

**Fig. IX. 7.** Dark-field (A, B, E, F, G) and brightfield (C, D) micrographs showing Gal mRNA expression in DRGs (A-D) and SCG (E-G) of GalOE (C-F) and Wt (B, G) mice. Several Gal-positive NPs can be seen in the DRGs of GalOE mice (A), belonging to the small (arrowheads) and large (double arrowheads) population (A, C, D). In comparison, only few small Gal-positive NPs are present in Wt mice (B). In the SCG, an extremely abundant expression of Gal in transgenic mice is observed (F), being much lower in Wt mice (G). Complete disappearance of the Gal signal in the SCG of a GalOE mouse is observed after incubation with a mixture of labeled and unlabeled probe used as a control for the *in situ* hybridization technique (E). Calibration bars: 100  $\mu\text{m}$  in G (applies to A, B, E, F, G); 25  $\mu\text{m}$  for (C, D).

**Fig. IX.8.** Microfotografías de fluorescencia confocal (A, B) y óptica (C-E), mostrando la piel de ratones GalSE (A, B, D) y Wt (C, E) luego de la incubación con el anticuerpo contra Gal. En ratones GalSE (A, B) se observan numerosos perfiles fibrosos Gal-IR en las glándulas sudoríparas ubicadas en la dermis, así como también algunas fibras positivas en proximidad a la epidermis (cabezas de flecha pequeñas). En ratones Wt (C) se observa la expresión de Gal en algunos procesos fibrosos dérmicos (cabezas de flecha grandes) e intraepidérmicos (cabezas de flecha pequeñas), aunque no se observó inmunoreacción en las glándulas sudoríparas. En la dermis de ratones GalSE (D) y Wt (E) se observaron numerosas fibras Gal-IR alrededor de vasos arteriales pequeños (asterisco), o en atajos nerviosos (cabezas de flecha grandes en D). Barra de calibración: 110  $\mu\text{m}$  para (A); 35  $\mu\text{m}$  para (B); 150  $\mu\text{m}$  para (C, D); 55  $\mu\text{m}$  para (E).

**Fig. IX. 8.** Confocal immunofluorescence micrographs of the skin of GALOE (A, B, D) and Wt (C, E) mice after incubation with Gal antiserum. In GalOE mice (A, B) several Gal-IR fibrous profiles are seen in the sweat glands in the dermis, as well as some positive fibers close to the epidermis (small arrowheads). In the Wt mice (C), some nerve bundles in the dermis (large arrowheads) and the epidermis (small arrowheads) show Gal immunoreactivity, although no staining could be seen in the sweat glands. In the dermis of both GalOE (D) and Wt (E) mice, many Gal-IR NPs are seen surrounding small arteries (asterisc) or present in fiber bundles (large arrowheads in D). Calibration bar: 110  $\mu\text{m}$  for (A); 35  $\mu\text{m}$  for (B); 150  $\mu\text{m}$  for (C, D); 55  $\mu\text{m}$  for E.

**Fig. IX. 9.** Gráficos mostrando el efecto de 7 días de axotomía del nervio ciático de ratones GalSE (6 Axo; 6 control) y Wt (6 Axo; 3 control) sobre el porcentaje de PNs Gal-IR en los GARDs contra- e ipsilateral, en comparación con los valores observados en ratones Wt (A), así como su influencia sobre el porcentaje de PNs Gal-IR pequeños (B) y grandes (C). Los datos se expresan como promedio  $\pm$  SEM. La diferencia entre los lados contra- e ipsilateral fue analizada usando el t-test pareado. En cuanto a la comparación de los lados ipsilaterales de los ratones GalSE y WT tratados entre sí y en comparación con los valores control, se utilizó el t-test no pareado. Los valores de *P* son como siguen: \*  $< 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Fig. IX. 9.** Graphs showing the effect of a 7 days axotomy of the sciatic nerve in GalOE (6 Axo; 6 control) and Wt (6 Axo; 3 control) mice on the percentage of contra- and ipsilateral DRG Gal-IR NPs in comparison to the values observed in control mice (A), as well as its influence on the percentage of small (B) and large (C) Gal-IR NPs. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The difference between contra- and ipsilateral side in each group was analyzed using the paired t-test. Comparison among ipsilateral sides of GalOE and WT treated mice and in comparison to the values in control mice were analyzed using the unpaired t-test. *P* values are as follow: \*  $< 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .



**Fig. IX.10.** Microfotografías de fluorescencia mostrando los GARDs contra- (A, C) e ipsilateral (B, D) de ratones GalSE (A, B) y Wt (C, D), luego de la incubación con el anticuerpo contra Gal. Observar el contraste en la expresión de Gal, destacándose el mayor número de PNs pequeños (cabeza de flecha) y grandes (doble cabeza de flecha) Gal-IR en los ratones transgénicos (A), en comparación con la expresión restringida del péptido a neuronas pequeñas de los ratones Wt (C). La axotomía del nervio ciático indujo un dramático aumento en el número de PNs Gal-IR, en todo tipo de tamaño neuronal, a predominio del tamaño pequeño y alcanzando niveles similares en los ratones GalSE (B) y Wt (D). Barra de calibración: 150µm for (A, B); 100 µm for (C, D).

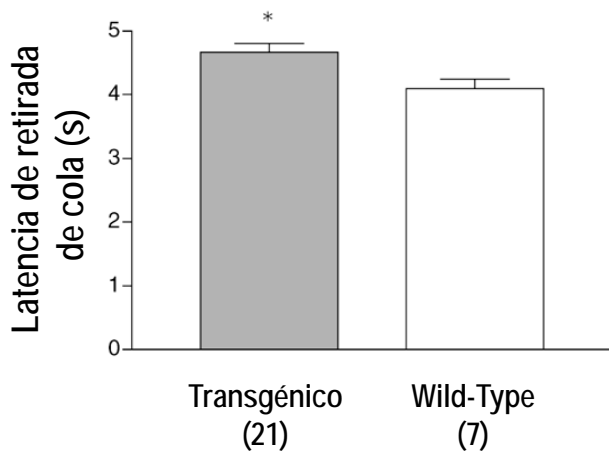
**Fig. IX. 10.** Immunofluorescence micrographs of contra- (A, C) and ipsilateral (B, D) DRGs of GalOE (A, B) and Wt (C, D) mice, after incubation with Gal antiserum. Observe the contrast between the two mice, with a more abundant expression of Gal in small (arrowheads) and large (double arrowheads) in the GalSE mice (A), in comparison with the Wt mice showing expression related to the population of small DRG neurons (C). The axotomy of the sciatic nerve induces a dramatic increase in the number of Gal-IR NPs, in all kind of neuronal sizes, but particularly in small neurons and to similar amounts in the GalSE (B) and Wt (D) mice. Calibration bar: 150 µm for (A, B); 100 µm for (C, D).

**Fig. IX. 11.** Microfotografías de fluorescencia mostrando cortes transversales del asta dorsal de la médula espinal contra- (A, C) e ipsilateral (B, D) a una axotomía del nervio ciático de 7 días de sobrevida en ratones GalSE (A, B) y Wt (C, D), incubadas con el anticuerpo contra Gal. En el lado contralateral del asta dorsal de ambos ratones (A, C), se observa una abundante inmunoreactividad para Gal en las láminas superficiales (I-II), además de algunas fibras Gal-IR en láminas más profundas (flechas). En el lado ipsilateral a la lesión, se produce un marcado aumento en la expresión de Gal en un neuropilo que se profundiza hacia las láminas III-V, especialmente en la parte media del asta dorsal (cabezas de flecha), tanto en los ratones transgénicos (B) como Wt (D). Barra de calibración: 100  $\mu$ m para (A-D).

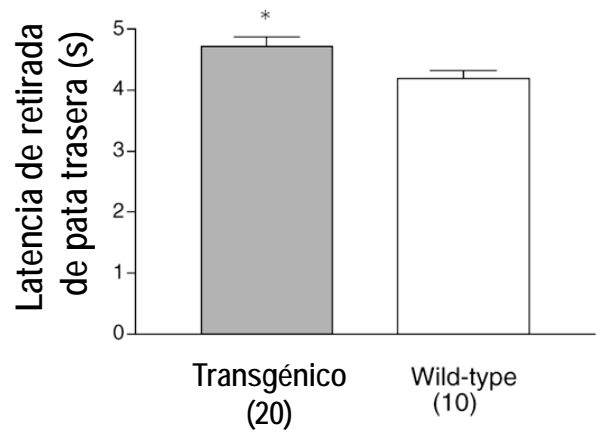
**Fig. IX. 11.** Immunofluorescence micrographs of trasnversal sections of the contra- (A, C) and ipsilateral (B, D) dorsal horn of the spinal cord, 7 days after axotomy of the sciatic nerve of GalOE (A, B) and Wt (C, D) mice, incubated with Gal antiserum. In the contralateral dorsal horn of both mice (A, C), an abundant imunoreactivity for Gal is observed in the superficial laminae (I-II), but some fibres are also seen in deeper laminae (arrows). In the ipsilateral side, a marked increase in Gal-IR can be seen in the deep neuropil towards laminae III-V, especially in the medial part of the dorsal horn (arrowheads) in both the transgenic (B) and Wt mice (D). Calibration bar: 100  $\mu$ m for (A-D).

**Fig. IX. 12.** Microfotografías ópticas (A-D) y confocal (E, F) de fluorescencia mostrando cortes transversales del asta ventral de la médula espinal contra- (A, C) e ipsilateral (B, D) a una axotomía del nervio ciático de 7 días de sobrevivida de ratones GalSE (A, B) y Wt (C, D), incubadas con el anticuerpo contra Gal (A-D) o la combinación de Gal y 5HT (E, F) en ratones control. Nótese un neuropilo Gal-IR mucho más profuso en los ratones GalSE (A, B), en comparación con ratones Wt (C, D). En el lado ipsilateral a la axotomía se observa, en ambos ratones, el aumento en la expresión de Gal en motoneuronas de ambos tipos de ratón (cabezas de flecha en B, D). Los experimentos de colocalización muestran una muy baja coexistencia de Gal con 5HT en las fibras descritas, lo que descarta su origen en neuronas serotoninérgicas bulboespinales en los ratones GalSE (E). Tampoco los ratones Wt mostraron colocalización de estos dos marcadores (F). (M=motoneuronas). Barras de calibración: 100  $\mu\text{m}$  en D (aplica desde A-D); 10  $\mu\text{m}$  para (E, F).

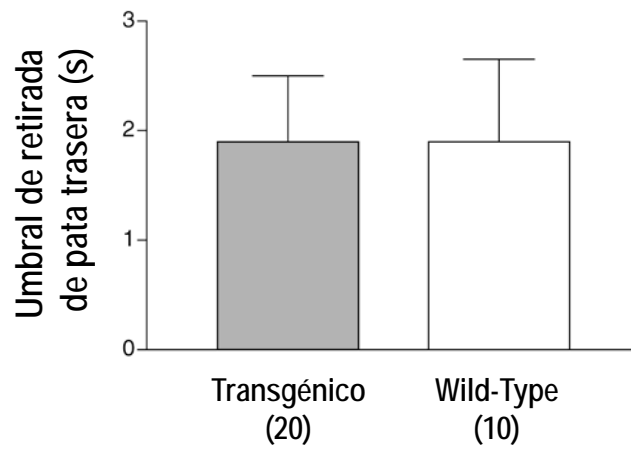
**Fig. IX. 12.** Immunofluorescence optic (A-D) and confocal (E, F) micrographs of transversal sections of the contra- (A, C) and ipsilateral (B, D) ventral horn of the spinal cord, 7 days after axotomy of the sciatic nerve of GALOE (A, B) and Wt (C, D) mice, incubated with Gal antisera, or the combination of Gal and 5HT in control mice (E, F). Note the numerous Gal-IR fibers present in the ventral horn of the GalOE mice (arrowheads in B, D) in comparison to the Wt mice (C, D). Ipsilateral to the axotomy both mice display an increase in the expression of Gal in several motoneurons (A, C). Colocalization experiments show a low, if any coexistence of Gal with 5HT in the previously described fibers, which apparently excludes a supraspinal origin in serotonin neurons in the brainstem in the GalOE mice (E). (M=motoneurons). A similar picture is observed for the Wt mice (F). Calibration bar: 100  $\mu\text{m}$  in D (applies to A-D); 10  $\mu\text{m}$  for (E, F).



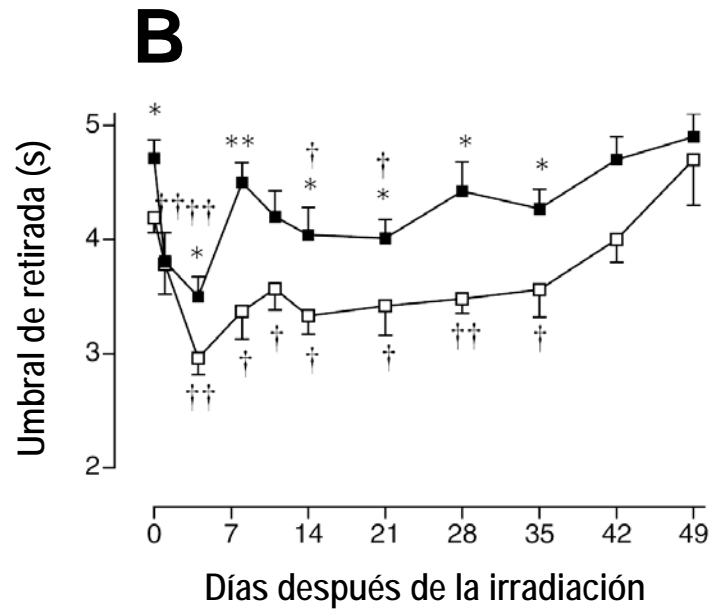
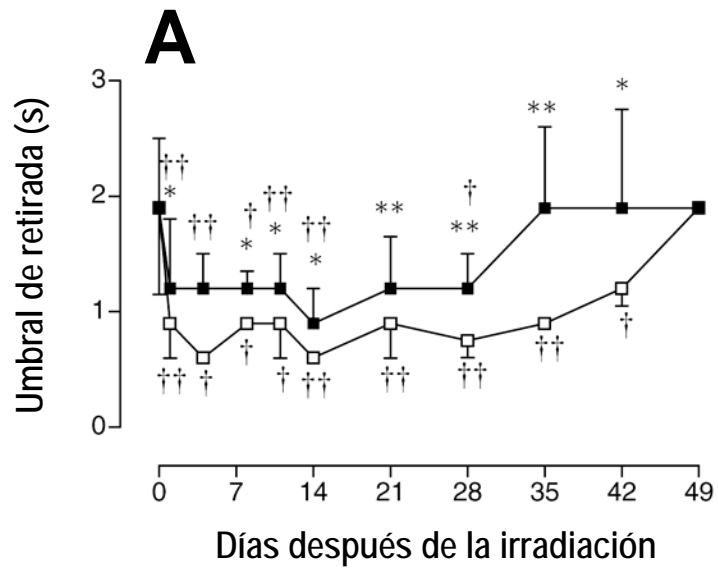
**A**

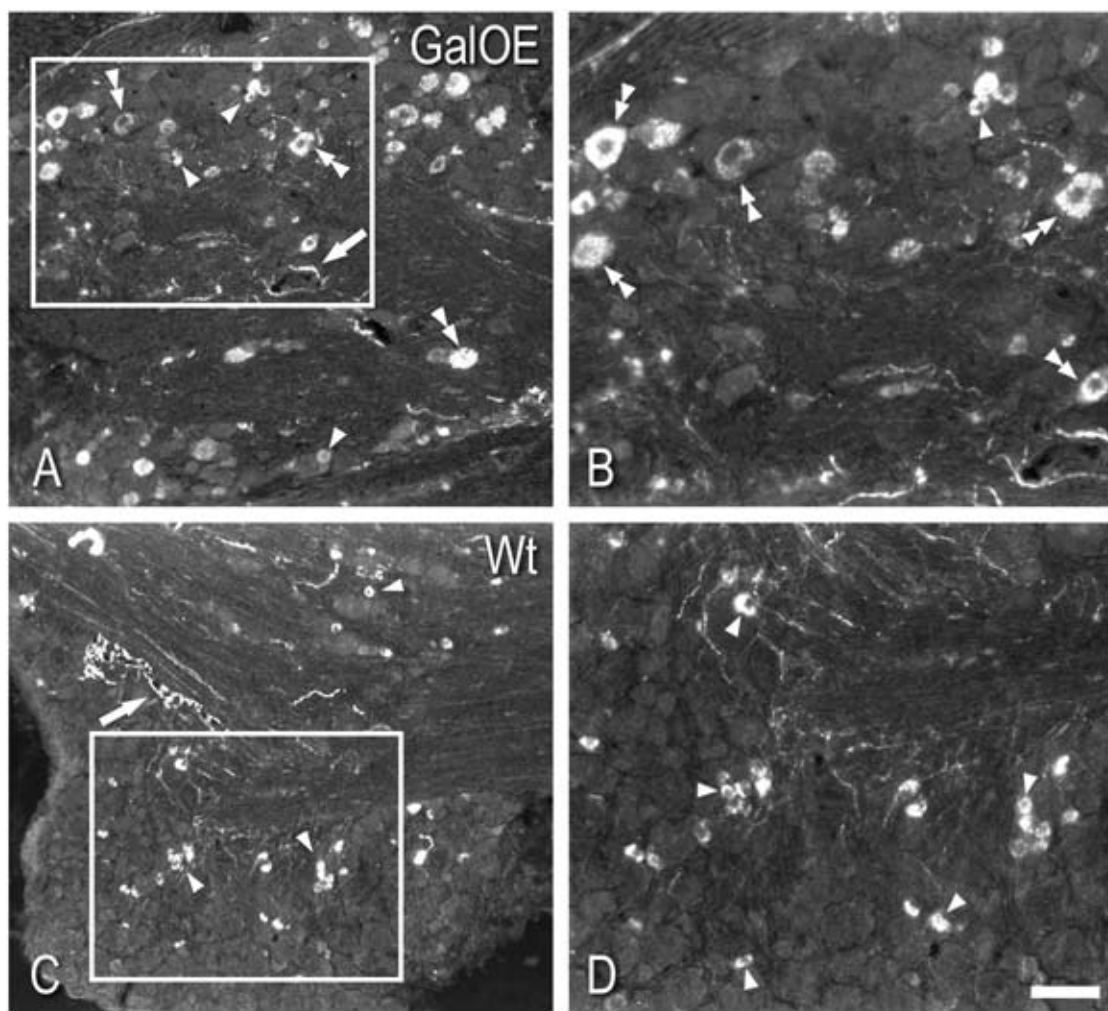


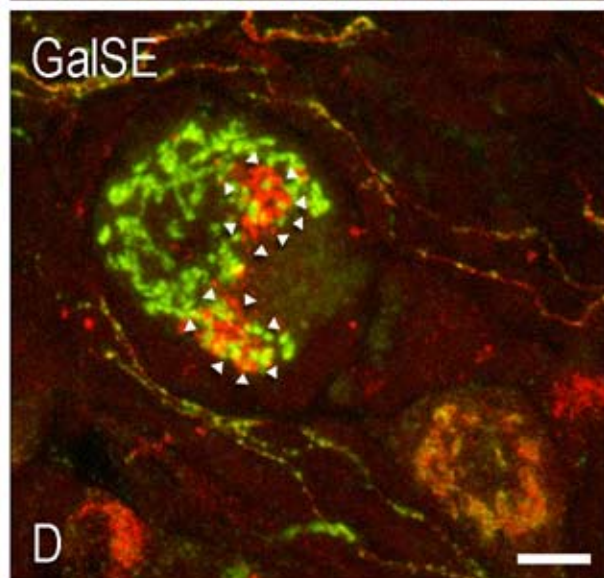
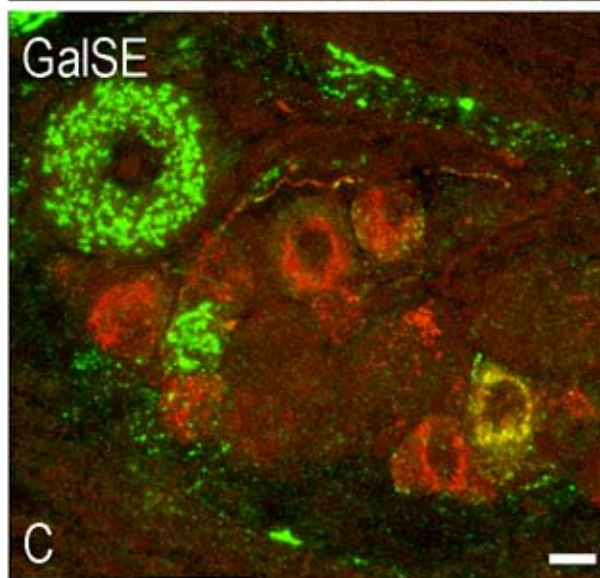
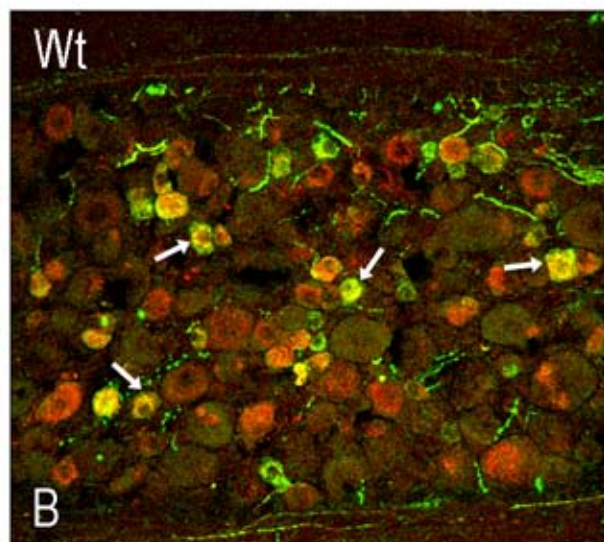
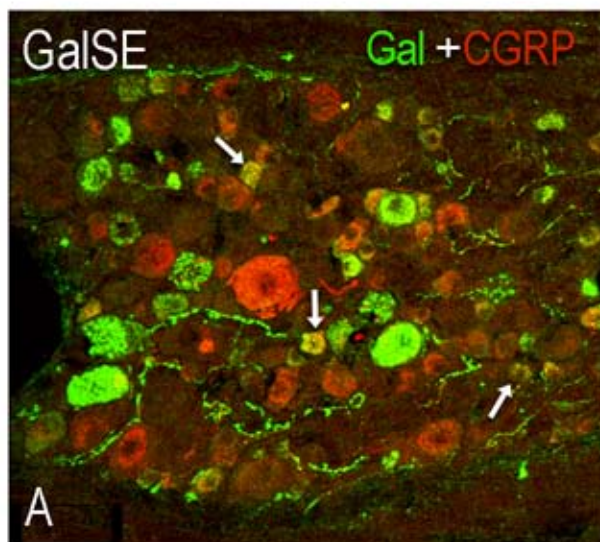
**B**

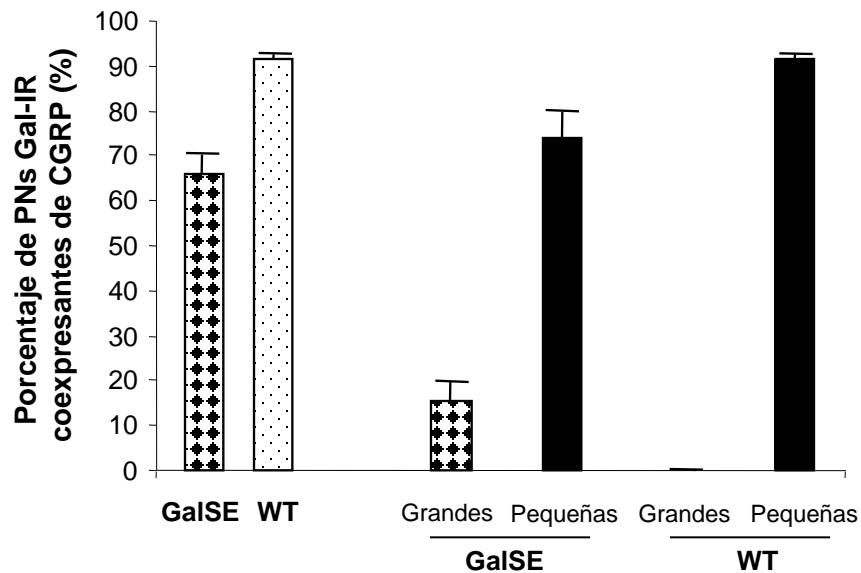


**C**

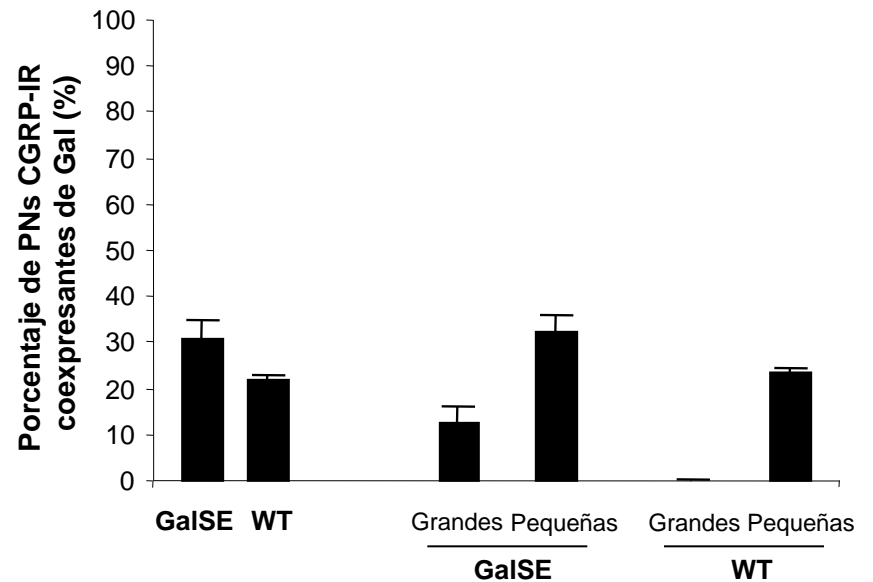








**A**

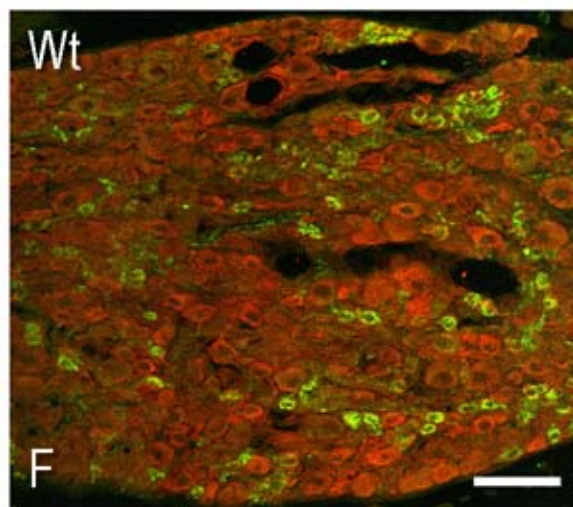
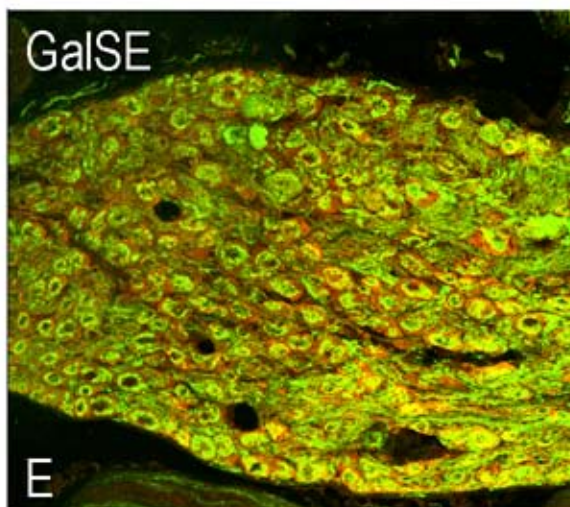
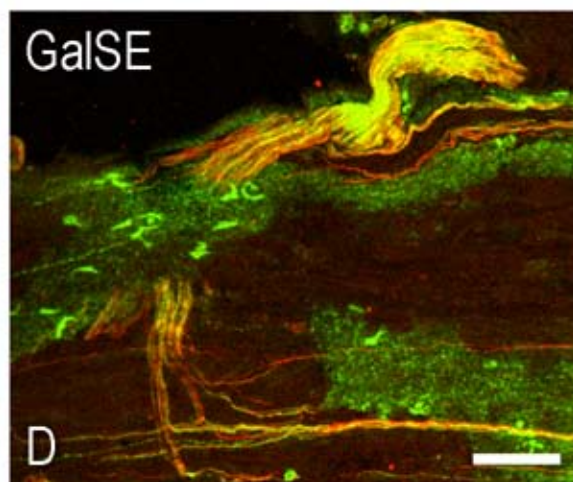
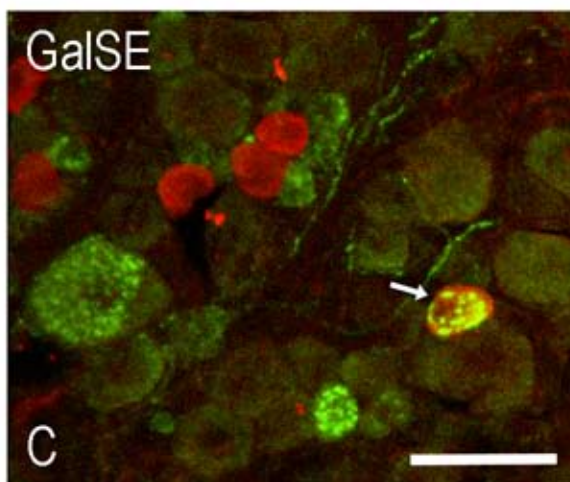
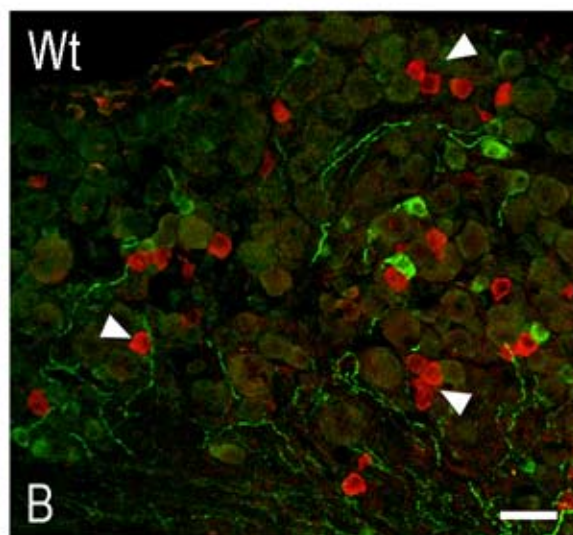
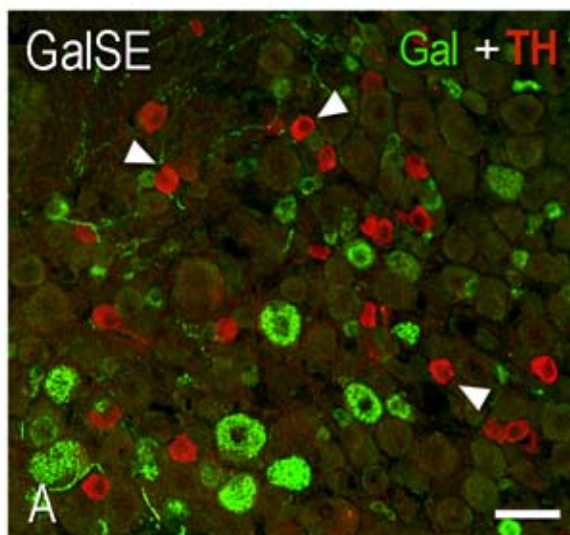


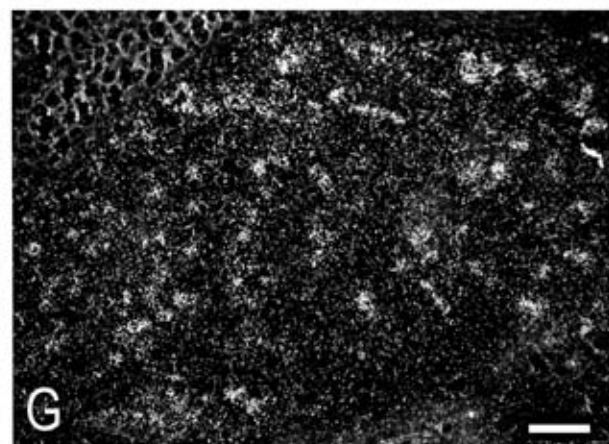
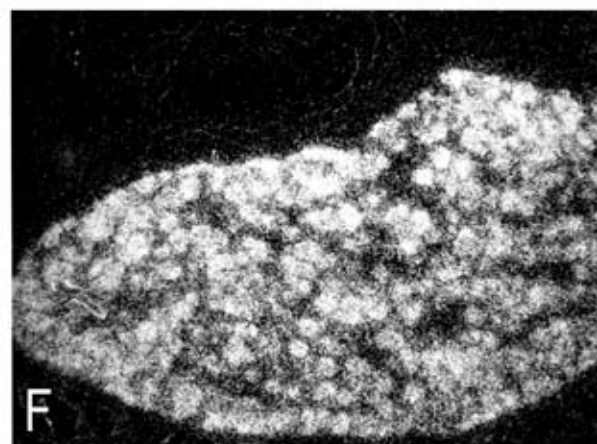
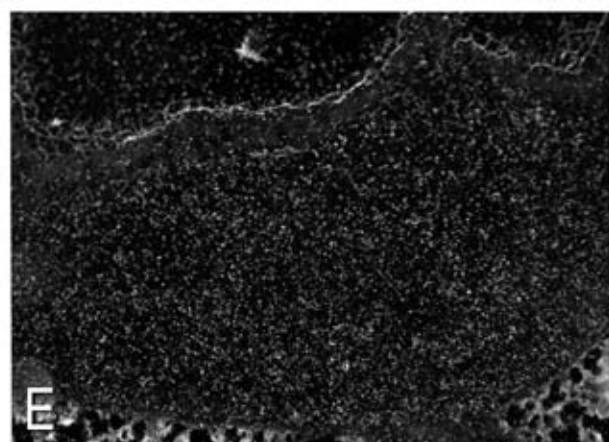
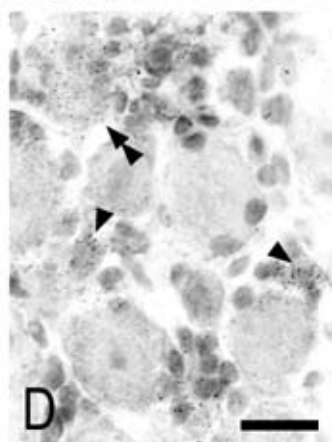
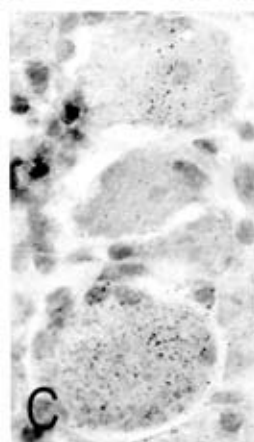
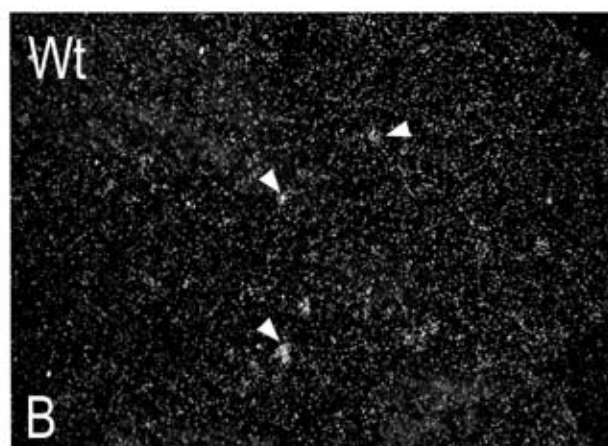
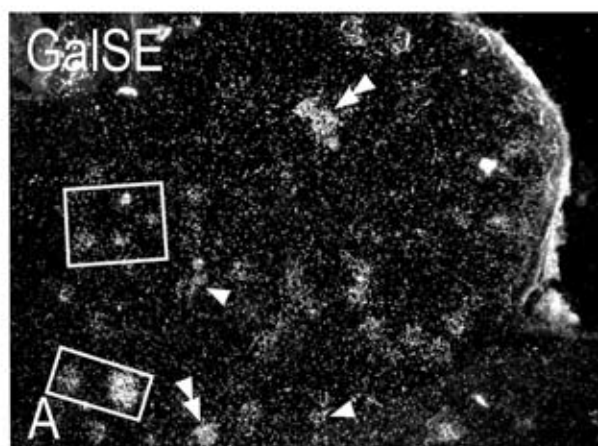
**B**

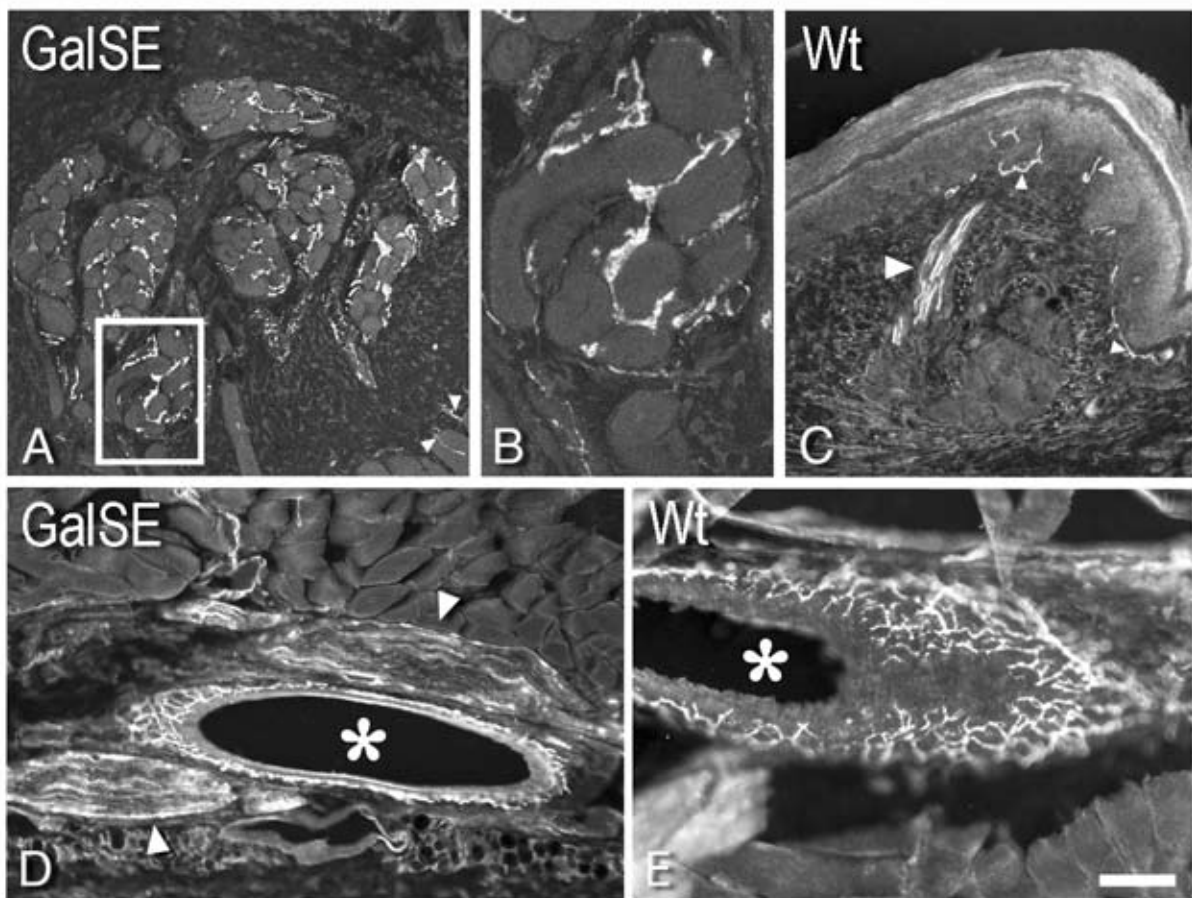
		OE		Wt		OE		Wt					
Porcentaje de coexistencia	Tamaño celular	Grande+Mediana+Pequeña		Grande+Mediana+Pequeña		Grande+Mediana+Pequeña		Grande+Mediana+Pequeña					
		Gal/CGRP <sup>+</sup> (A)	66	(900)	91	(451)	15	(141)	74	(759)	0	(0)	91
CGRP/Gal <sup>+</sup> (B)		31	(2317)	22	(2009)	12	(201)	32	(2116)	0	(186)	23	(1823)
Gal/TH <sup>+</sup>		3	(646)	0	(259)	0	(142)	4	(504)	0	(0)	0	(259)
TH/Gal <sup>+</sup>		5	(437)	0	(366)	0	(0)	5	(437)	0	(0)	0	(366)

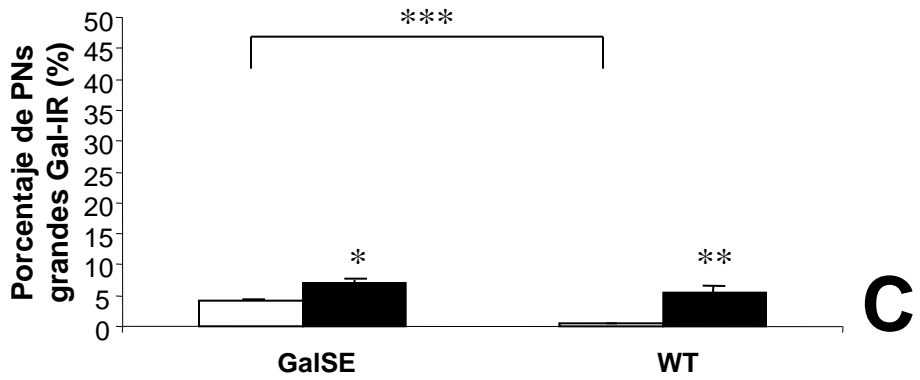
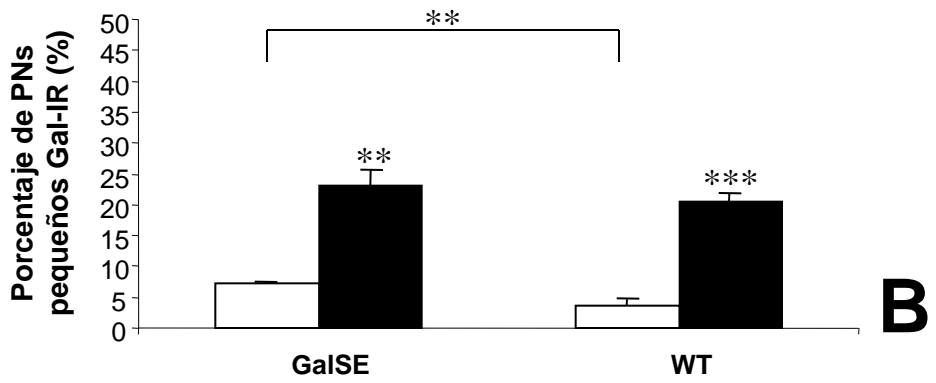
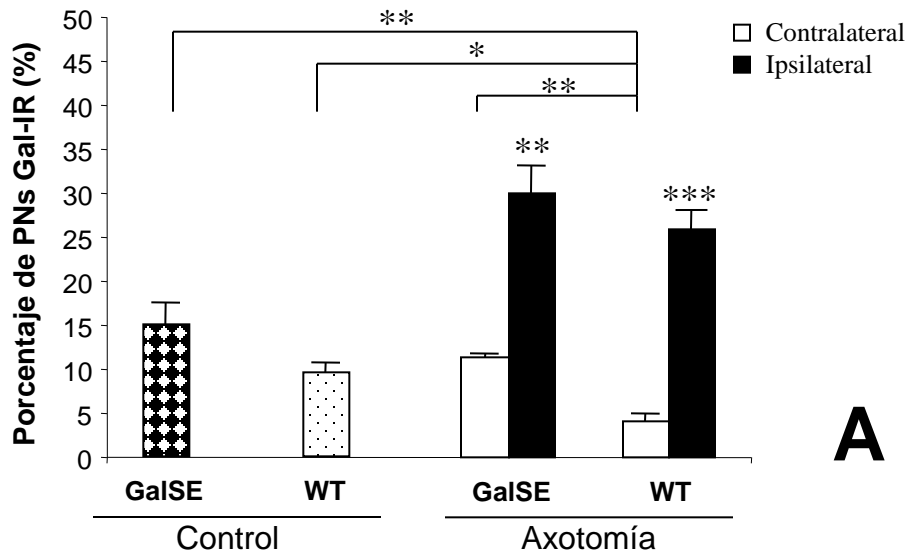
**C**



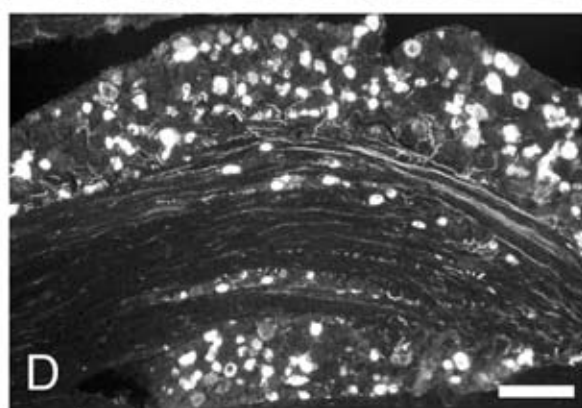
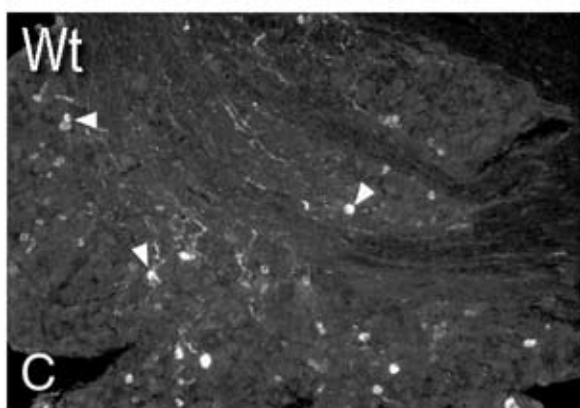
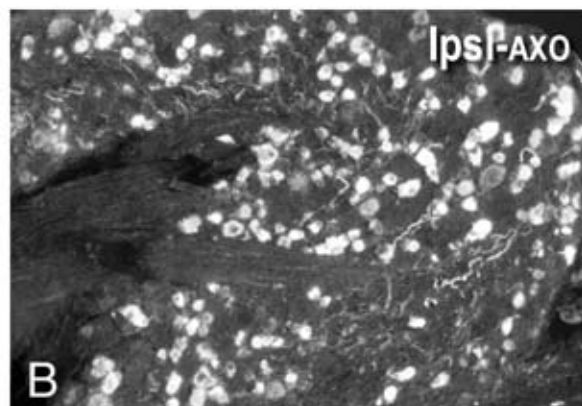
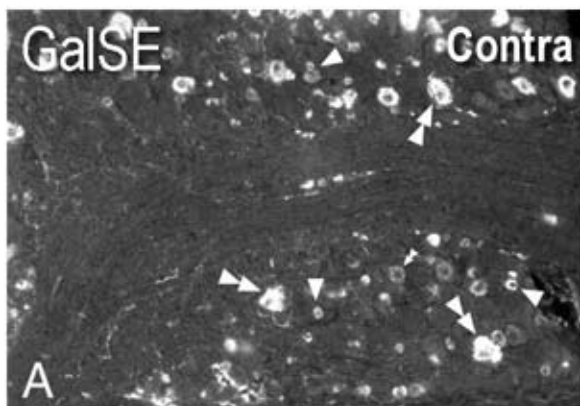


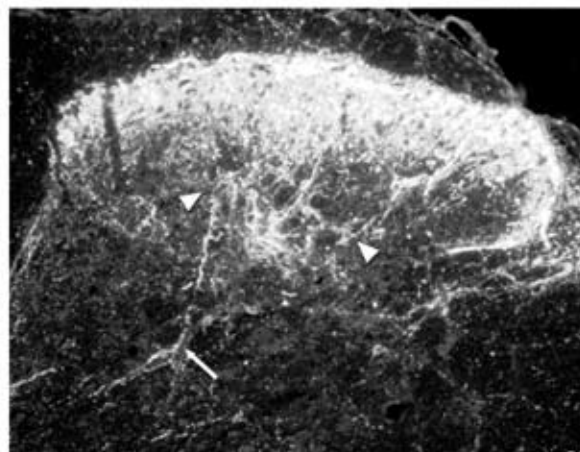
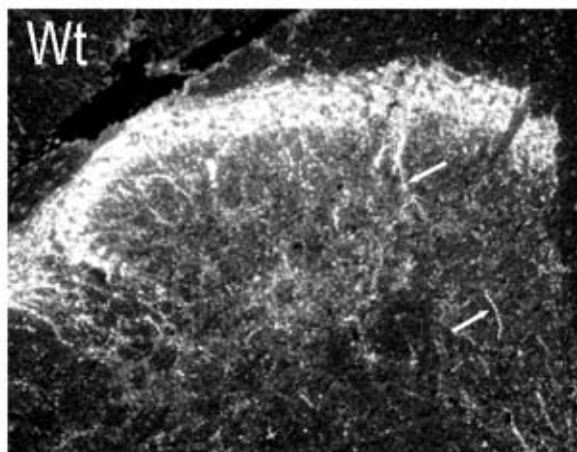
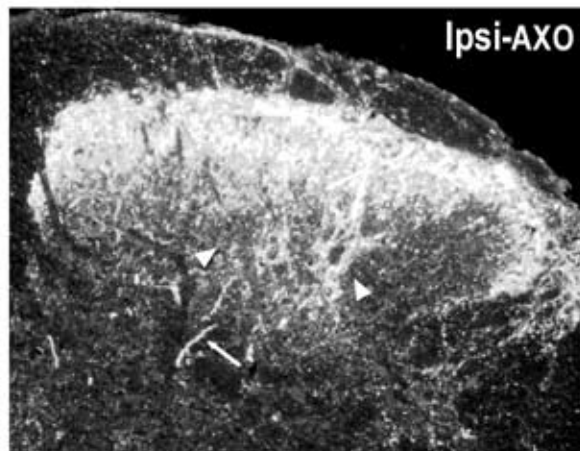
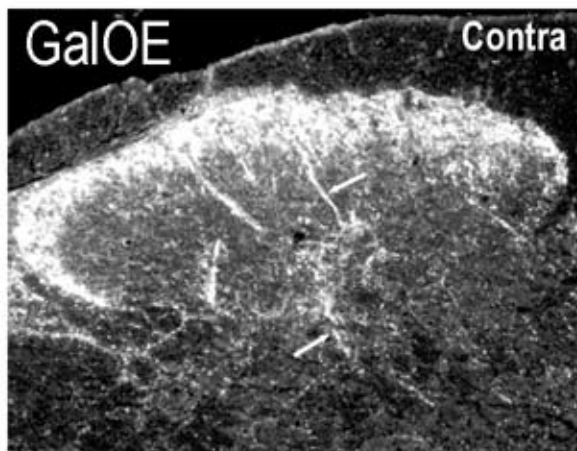


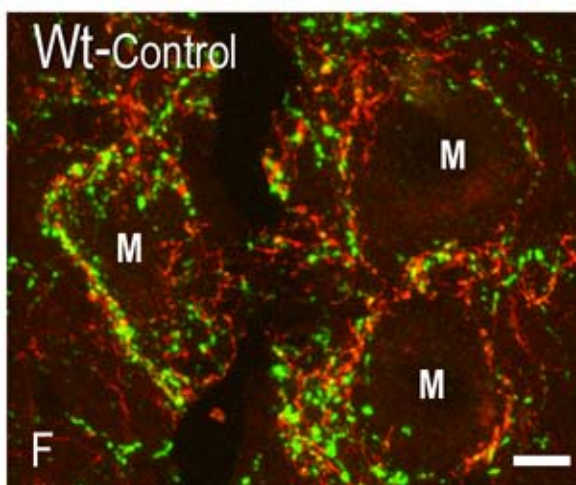
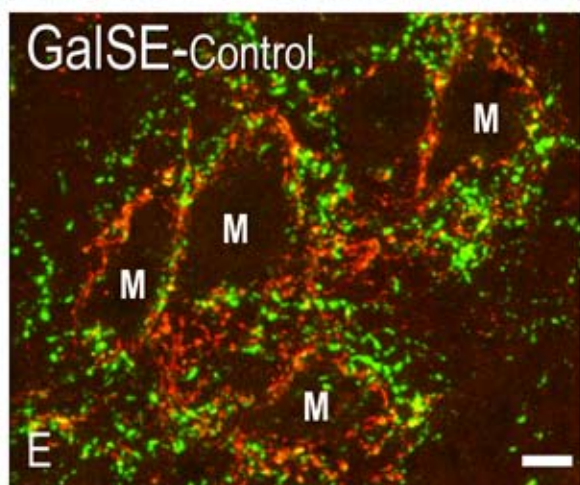
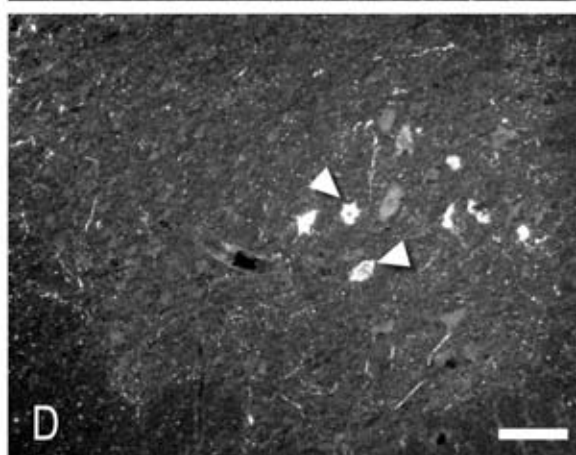
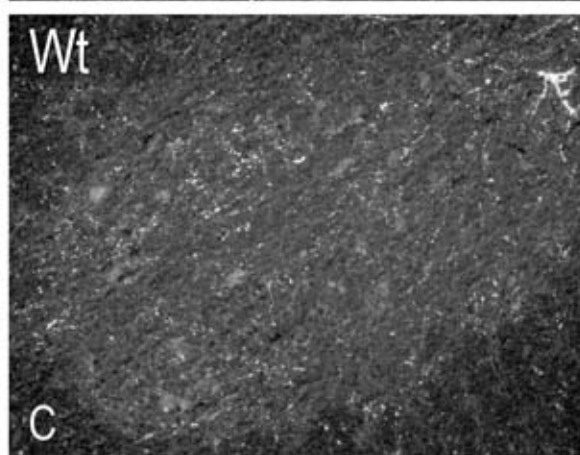
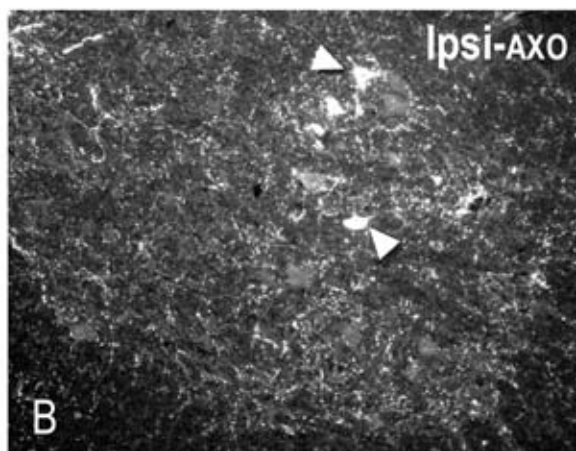
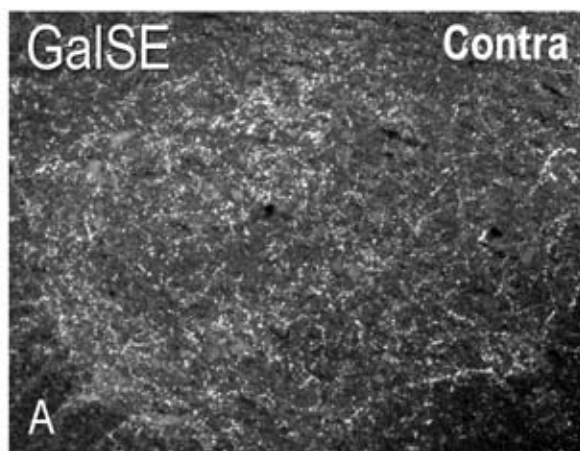












**Distribución del RY1 en neuronas  
superficiales y profundas del asta dorsal de  
la médula espinal lumbar de la rata. Análisis  
de inmunohistoquímica por flotación**



## Introducción

El RY1 se observa en neuronas aferentes primarias de tamaño pequeño de la rata, con un aspecto punteado y localizado cerca de la membrana plasmática (Zhang et al., 1994a, b; 1999). En algunas instancias puede verse en acúmulos citoplasmáticos, aunque el análisis por microscopía confocada demostró que los mismos se relacionan en todo momento con el plasmalema (Zhang et al., 1999).

Por su parte, la médula espinal expresa el ARNm y la proteína del RY1 en neuronas de en la parte interna de la lámina II del asta dorsal. También aquí se ha observado que la inmunoreactividad se localiza en la proximidad de la membrana plasmática y sus procesos dendríticos, aunque estaría ausente en los axones de dichas neuronas (Zhang et al., 1994a, b; 1999). Por el contrario, la demostración del RY1 en láminas más profundas ha sido esquiva, con la excepción de algunas neuronas reunidas alrededor del conducto del epéndimo en la la lámina X, así como en algunas neuronas simpáticas ubicadas en las astas laterales de la médula espinal dorsal (Zhang et al., 1994a, b; 1999; Kopp et al., 2002). Sin embargo, estudios recientes indican la presencia de neuronas RY1-IR en láminas profundas del asta dorsal tanto en el ratón (Shi et al., 2001) como en la rata (Brumovsky et al., 2002).

Estudios de microscopía electrónica mostraron que las neuronas RY1-IR localizadas en la lámina II son contactadas por axones aferentes RY1-negativos, aunque algunas fibras terminales fueron levemente positivas para el receptor en unos pocos glomérulos espinales (Zhang et al., 1999). Finalmente, tanto en la lámina II, como en las láminas I, III, V y X se hallan varias neuronas NPY positivas (Ji et al., 1994).

**Fig. X.1.** Dibujo esquemático de un modelo de internalización y reciclado del RY1 en células HEK293. Los receptores son internalizados por vía de las vesículas recubiertas con clatrina hacia el compartimiento EE/SE con una constante  $k_{e1}$  y luego llevados al RE con una constante  $k_1$ . El reciclado desde estos dos compartimientos se caracteriza por las constantes  $k_{r1}$  y  $k_{r2}$ , respectivamente. Las vías neo-sintética y degradativa así como otras vías no mostradas en este modelo se indican con flechas de puntos (tomado de Giquiaux et al., 2002). EE/SE: endosomas tempranos/endosomas de distribución; RE: endosomas de reciclado; LE: endosomas tardíos; Ly: lisosomas; N: núcleo; TGN: red trans-Golgi.

**Fig. X. 1.** Schematic drawing of a model for internalization and recycling of the Y1R in HEK293 cells. Receptors internalize via the clathrin-coated pits pathway to the EE/SE compartment with rate constant  $k_{e1}$ . Recycling from these two compartments toward the surface is characterized by rate constant  $k_{r1}$  and  $k_{r2}$ , respectively. Neo-synthetic and degradative pathways and other pathways not considered in our model are shown by dotted arrows (taken from Giquiaux et al., 2002). EE/SE: early endosomes/sorting endosomes; RE: recycling endosomes; LE: late endosomes; Ly: lysosomes; N: nucleus; TGN: trans-Golgi network.

Hasta el presente, no existen trabajos que demuestren la internalización del RY1 en neuronas de los GARDs o el asta dorsal de la médula espinal. Sin embargo, un estudio reciente en células HEK293 propone un modelo de internalización y reciclado del RY1 (Fig. X.1) (Giquiaux et al., 2002).

En el presente trabajo, utilizando el mismo anticuerpo descrito por Kopp y cols. (2002) y utilizado en esta tesis en el capítulo VI, sumado a la técnica de inmunohistoquímica de inmersión y la técnica de TSA (Adams, 1992), describimos la localización del RY1 en neuronas presentes en láminas profundas del asta dorsal de la médula espinal lumbar. Asimismo, mostramos una localización que no solamente parece estar relacionada a la membrana plasmática, sino también al citoplasma.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho (n = 9; 250-300 gs; B&K, Stockholm, Sweden). Las mismas fueron mantenidos en un ciclo día/noche de 12hs cada uno, con agua y comida *ad libitum*.

Los experimentos fueron conducidos siguiendo las indicaciones éticas de la SFN en el uso de animales de experimentación, siendo además aprobadas por el comité sueco local (Stockholms Norra Djurförsöksetiska Namd) (#206/99).

### **Inmunohistoquímica**

**Preparación del tejido.** Los animales fueron profundamente anestesiados con Pentobarbital sódico (Mebumal; 60 mg/Kg) y perfundidos a través del corazón con 50 ml de buffer Tyrode a 37°C, seguido de 50 ml de una mezcla de 4% de paraformaldehído y 0.2% de ácido pícrico 0.16 M en buffer fosfato (PB, pH 6.9) a 37°C, y

finalmente con 300 ml del mismo fijador a 4°C (Zamboni y De Martino, 1967). Los niveles L3-6 de la médula espinal fueron extraídos y sumergidos en el mismo fijador por 90 min a 4°C. El mismo fue luego reemplazado por sucrosa al 10 % diluída en buffer fosfato salino (PBS; pH 7.2) conteniendo 0.01% de azida sódica (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 0.02 % de bacitracina (Sigma) y mantenido durante 48-72 horas.

***Inmunohistoquímica de inmersión.*** Se obtuvieron secciones parasagitales de la médula espinal de 50 µm usando un crióstato (Microm, Heidelberg, Germany), las que fueron inmediatamente sumergidas en PBS. Luego de dos lavados (20 min cada uno), las secciones fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con la keyhole limpet hemocyanin y dirigido contra los 13 últimos aminoácidos del segmento C-terminal del RY1 (1:8000), por 72 hs. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NPY (1:1000) (Grouzman et al., 1992) por 48 hs, y con otro anticuerpo anti-CGRP producido en conejillo de indias (1:1000) (Península), previo lavado en PBS. La incubación con más de un anticuerpo primario fue secuencial (doble y triple tinción), con ciclos de 24 a 48 horas de incubación por cada anticuerpo, y en pocas oportunidades se mezclaron dos anticuerpos primarios. Una vez culminada la incubación con los anticuerpos primarios, el péptido o receptor que así lo requiriera (usualmente por baja expresión) fue procesado usando la técnica de amplificación de la tiramida (TSA plus). Los tiempos de incubación para esta técnica fueron más extensos de lo habitual. En los casos de doble y triple tinción, se procedió con la técnica de inmunofluorescencia regular. Brevemente, se hicieron dos lavados en TNT (kit) de 20 min cada uno, seguidos de 1 h de incubación en TNB (kit) a TA. Posteriormente, se continuó con 2 hs de incubación con un conjugado de anticuerpo secundario y HRP contra conejo diluído 1:400 en TNB a 37°C. Luego de dos lavados de 20 min en TNT, se procedió a la incubación con un conjugado de tiramida biotinilada y

FITC (kit) diluído 1:100 en diluyente de amplificación (kit) a TA. Una vez finalizado este tiempo, se hicieron dos lavados en PBS de 15 min cada uno a TA y se continuó con la incubación de las secciones con un anticuerpo secundario contra conejillo de indias conjugado con Rojo de Texas o Cy3 diluído 1:100 en PBS a 37°C por 2 hs. Las secciones con triple tinción fueron nuevamente lavadas con PBS e incubadas por 2 h con otro anticuerpo secundario contra ratón conjugado con Cy5 diluído 1:100 en PBS a 37°C. Finalmente, las secciones fueron lavadas en PBS a 4°C por toda una noche para luego ser montadas sobre portaobjetos gelatinizados y cubiertas con cubreobjetos previa aplicación de una solución al 2.5% de DABCO (Sigma, Mo, USA) en glicerina.

Las imágenes fueron analizadas usando un microscopio confocal Bio-Rad Radiance Plus (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) instalado en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 equipado con objetivos 10 x/0.45 N.A., 20 x/0.75 N.A. y 60x de aceite/1.40 N.A. Las imágenes para los distintos fluoróforos se tomaron siempre por separado. La fluoresceína fue excitada usando la línea de 488 nm del láser de ion argón y su señal detectada usando un filtro de emisión HQ 530/60 (Bio-Rad). Para la detección de la señal de la rodamina roja-X, se usó la línea de 543 nm del láser verde HeNe en combinación con el filtro de emisión HQ 590/70 (Bio-Rad), mientras que la detección de la señal producida por Cy5 se utilizó la línea de 635 nm del láser de diodo rojo en combinación con el filtro de emisión HQ660LP (BioRad).

**Controles.** Varias secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario, con omisión del anticuerpo primario y procesados con la técnica de TSA plus o de inmunofluorescencia regular.

### **Hibridación *in situ***

Se utilizaron sondas complementarias para los nucleótidos 546-585 del ARNm de rata para el RY1 (Eva et al., 1992), marcado con  $^{35}\text{S}$ - $\gamma$ -dATP (New England Nuclear, Boston, MA, USA) en el extremo 3', usando la enzima deoxynucleotidyltransferasa (Amersham, UK). Las sondas marcadas fueron purificadas usando microcolumnas de purificación ProbeQuant G50 (Amersham, UK). La actividad específica de las sondas marcadas fue de  $1-4 \times 10^6$  cpm/ng de sonda.

Todos los animales procesados fueron sacrificados por decapitación y los GARDs L5 contra- e ipsilateral a la lesión y médula espinal lumbares fueron rápidamente disecados y congelados en hielo seco. Posteriormente, los tejidos fueron cortados a  $14 \mu\text{m}$  y montados en portaobjetos ProbeOn (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Las secciones a hibridar fueron secadas a TA en una campana de extracción durante una noche y luego incubadas con la sonda respectiva (0.5 ng) por 16-18 h a  $42^\circ\text{C}$  (ver págs. 33, 34 de la presente tesis).

Después de la hibridación, las secciones fueron lavadas con SSC 1X a  $55^\circ\text{C}$ , cuatro veces de 30 min, seguido de un lavado de 1h a TA, rápidamente deshidratadas y secadas a TA en la campana de extracción. Los portaobjetos fueron sumergidos luego en la emulsión fotográfica líquida NTB2 (Kodak, Rochester, NY, USA). Cumplido el tiempo de exposición apropiado (2 días a 6 semanas), las secciones fueron reveladas usando la solución Kodak D19 y fijadas con el fijador Kodak 3000. Estos portaobjetos fueron montados con cubreobjetos usando glicerol y observados al microscopio para su análisis en campo oscuro. En un paso posterior, y en caso de ser necesario, las secciones fueron desmontadas y contrateñidas con azul de toluidina para ser re-montadas con

cubreobjetos usando Permount (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey, USA) para su posterior visualización por campo claro.

Las secciones fueron examinadas usando un microscopio Nikon Eclipse E800 equipado con un condensador de campo oscuro e iluminación de epi-polarización. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon DN-100 montada al microscopio Nikon Eclipse.

## Resultados

### Láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal

Pudo observarse una intensa banda RY1-IR en la lámina II, extendida hacia las láminas I y III (Fig. X.2a). En gran parte se trató de numerosos cuerpos celulares fuertemente inmunoreactivos para el RY1, envueltos por un denso entramado dendrítico (Fig. X.2C, D1-4). Muy ocasionalmente pudo observarse intercalada entre las fibras del tracto de Lissauer (lámina I) alguna neurona RY1-IR (Fig. X.2b). La inmunoreactividad para el RY1 estuvo localizada principalmente en proximidad de la membrana plasmática, en neuronas que no superaron los 20  $\mu\text{m}$  (Fig. X.2C; D1-4; 5e-f).

Los estudios de colocalización mostraron que en su gran mayoría, la expresión del RY1 estuvo exclusivamente presente en neuronas y procesos fibrosos locales, mientras que la expresión de CGRP (usado como marcador de fibras aferentes) fue preponderante en fibras longitudinales de la lámina I, y en atajos fibrosos entrantes hacia las láminas profundas del asta dorsal (Fig. X. 3a). Sin embargo, pudieron observarse algunas fibras entrantes en la lámina I, probablemente fibras aferentes provenientes de las raíces dorsales, teñidas tanto para el RY1 como para CGRP (Fig. X. 3b). Asimismo, algunas pocas fibras presentes en la lámina III colocalizaron tanto el receptor como el péptido (Fig. X. 3c, d, e).

Láminas III-V del asta dorsal de la médula espinal

En las láminas profundas del asta dorsal se observaron numerosas neuronas RY1-IR, singularmente agrupadas en el ensanchamiento lumbar de la médula espinal, y en particular entre las láminas III y IV (Figs. X. 2a; 4a).

En la zona de agrupación del ensanchamiento lumbar, las neuronas presentaron morfología ovoidea, siendo envueltas por sus proyecciones dendríticas orientadas en el sentido longitudinal (Fig. X.4a). Por el contrario, otras neuronas profundas se caracterizaron por poseer una prolongación dendrítica muy evidente, con ramificación en láminas más superficiales del asta dorsal, y probablemente una proyección axónica dirigiéndose hacia láminas profundas (Fig. X.4b).

La expresión del RY1 en las “neuronas profundas” fue distinta en los cuerpos celulares, en comparación con la observada en láminas superficiales. Así, en estas neuronas, muchas de las cuales presentaron un corte de forma piramidal de sus cuerpos celulares, la expresión del receptor no sólo pudo detectarse en la proximidad de la membrana plasmática, sino también en el interior del citoplasma, como lo reveló el análisis cuidadoso de secciones de 1 µm de espesor tomadas con el microscopio confocal (Fig. X. 5a, b). Este patrón pudo observarse en la mayoría de las neuronas profundas analizadas y contrastó con lo observado en láminas superficiales del asta dorsal, donde la expresión del RY1 estuvo principalmente confinada a la membrana plasmática (Fig. X.5e-f’).

Los estudios de hibridación *in situ* mostraron la expresión del ARNm del RY1 tanto en la lámina II, como en neuronas profundas del asta dorsal (Fig. X. 4c, d)



Lámina X del asta dorsal de la médula espinal

Cortes longitudinales de la lámina X del asta dorsal en la proximidad del canal central de la médula espinal pusieron en evidencia un gran número de neuronas RY1-IR (Fig. X.6a). La mayoría de estas neuronas presentó proyecciones transversales y longitudinales, algunas de las cuales parecieron interconectar diferentes niveles espinales (Fig. X.6a). Asimismo, se observaron haces fibrosos longitudinales RY1-IR a todo lo largo del segmento medular estudiado (Fig. X.6b, c). Acompañando a los mismos, una serie de haces paralelos CGRP-IR se destacaron de aquellos RY1-IR (Fig. X.6b, c).

**Fig. X.2.** Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando cortes sagitales del asta dorsal de la médula espinal de rata, teñidas con el anticuerpo contra el RY1. En A, se observa una banda RY1-IR intensa ubicada en las láminas I-II del asta dorsal, mientras que se detecta la presencia de un grupo de neuronas profundas localizadas en las láminas III-V (cabezas de flecha). En B, se muestra una neurona RY1-IR aislada en el tracto de Lissauer del asta dorsal. Varias neuronas presentes en las láminas superficiales del asta dorsal (A, C) se confunden en un entramado dendrítico RY1-IR muy profuso (flechas). D1 a D4 muestran 4 niveles distintos de 1  $\mu\text{m}$  de espesor de la imagen en C, donde pueden apreciarse más claramente los cuerpos celulares destacados en C (flechas). Barras de calibración: 100  $\mu\text{m}$  para (A); 25  $\mu\text{m}$  para (B-D4).

**Fig. X. 2.** Immunofluorescence confocal micrographs of sagittal sections of the dorsal horn of the rat spinal cord, stained with the Y1R antiserum. In A, a strongly Y1R-IR band is observed in laminae I-II, whereas in deeper laminae (III-V) a group of Y1R-positive neurons can be seen (arrowheads). In B, an isolated neuron in the Lissauer's tract is shown. Several Y1R-expressing neurons in superficial laminae (A, C) are surrounded by an abundant dendritic network (arrows). Image C is shown in four different levels in D1-D4 (each one  $\mu\text{m}$  thick) allowing a more clear visualization of the cell bodies. Calibration bars: 100  $\mu\text{m}$  for (A); 25  $\mu\text{m}$  for (B-D4).

**Fig. X.3.** Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando cortes sagitales del asta dorsal de la médula espinal de rata, co-incubadas con anticuerpos contra el RY1 (verde), CGRP (rojo) y NPY (azul). En A, se observa una intensa inmunoreactividad del RY1 en las láminas I-II, a la que se superponen numerosas fibras CGRP-IR sensoriales provenientes de las raíces dorsales (flechas pequeñas). En láminas más profundas, se observan varias neuronas RY1-IRs (cabezas de flecha). También se observan fibras CGRP-IRs que se introducen más profundamente en el asta dorsal (flechas grandes). En B, una fibra CGRP-IR proveniente de la raíz dorsal hacia la lámina I-II del asta dorsal co-expresa el RY1 (doble flecha). Además, se observan finas fibras NPY (doble cabeza de flecha) y CGRP-IRs (flecha pequeña) en la sustancia blanca por encima de la lámina I del asta. Asimismo algunas neuronas NPY-IRs (cabezas de flecha abiertas) se hallan cerca de otras RY1-IRs (cabeza de flecha cerrada). Ocasionalmente, se observan algunas fibras intensamente inmunoreactivas para CGRP y el RY1 ingresando a láminas profundas del asta dorsal (C-E e inserto en C). Barras de calibración: 100  $\mu$ m para (A); 20  $\mu$ m en B (aplica a B-E); 10  $\mu$ m para inserto en (C).

**Fig. X. 3.** Immunofluorescence confocal micrographs of sagittal sections of the dorsal horn of the rat spinal cord, stained with the Y1R (green), CGRP (red) and NPY (blue) antisera. In A, an intense Y1R immunoreactivity is seen in laminae I-II, overlapping with several sensory CGRP-IR fibers, travelling through the dorsal roots (small arrows). Y1R-IR neurons are seen in deeper laminae (arrowheads). Some deep CGRP bundles are also seen (large arrows). In B, one CGRP-IR fiber is seen in the dorsal root running towards the superficial laminae of the spinal cord, coexpressing Y1R. NPY- (double arrowheads), and CGRP-IR (small arrows) thin fibers are seen in the white matter just above the lamina I, as well as some NPY-IR neurons (open arrowheads), in close relation to Y1R-IR cell bodies (filled arrowhead). Occasionally, some intense CGRP- and Y1R-IR fibers can be seen entering the deep laminae of the dorsal horn can be seen (C-E and insert in C). Calibration bars: 100  $\mu$ m for (A); 20  $\mu$ m in B (applies to B-E); 10  $\mu$ m for insert in (C).

**Fig. X.4.** Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando cortes sagitales del asta dorsal de la médula espinal de rata, co-incubadas con el anticuerpo contra el RY1 (verde), y CGRP (rojo). En A, se observa un grupo de neuronas RY1-IR agrupadas en las láminas III-IV del asta dorsal. Obsérvese el entramado fibroso RY1-IR que parece envolverlas, probablemente sus procesos dendríticos. Además, algunas fibras CGRP-IR alcanzan la proximidad de dichas neuronas (flechas pequeñas). En B, se muestra una neurona RY1-IR presente en láminas III-IV del asta dorsal, la cual envía varios procesos dendríticos hacia las láminas superficiales (cabezas de flecha pequeñas), y quizás un proceso axonal (cabeza de flecha grande) dirigiéndose hacia láminas más profundas. Barras de calibración: 20  $\mu\text{m}$  (A); 100  $\mu\text{m}$  (B).

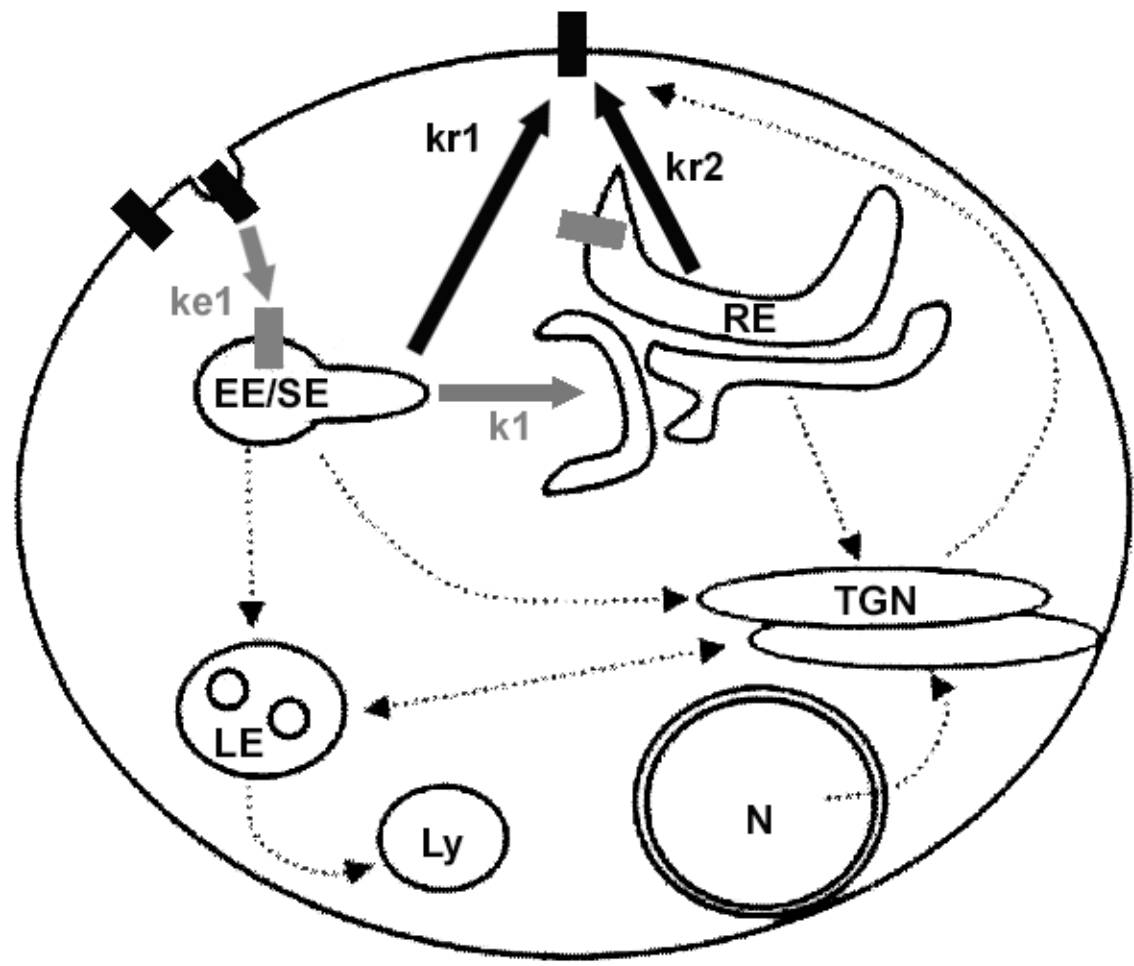
**Fig. X. 4.** Immunofluorescence confocal micrographs of sagittal sections of the dorsal horn of the rat spinal cord, co-stained with Y1R (green) and CGRP (red) antisera. In A, a group of Y1R-IR neurons is observed in laminae III-IV of the dorsal horn. Note the numerous Y1R-IR fibers surrounding these neurons, probably representing dendritic processes. Also, some CGRP-IR fibers reach this group of neurons (small arrows). In C, a Y1R-IR neuron in deeper laminae of the spinal cord is shown, sending several dendritic proceses towards superficial laminae (small arrowheads) and possibly an axonal process into deeper laminae (large arrowhead) Calibration bars: 20  $\mu\text{m}$  (A); 100  $\mu\text{m}$  (B).

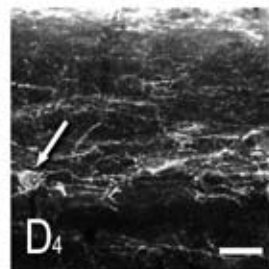
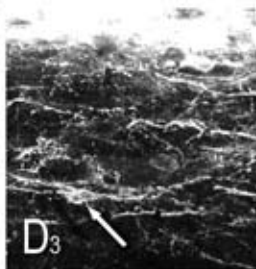
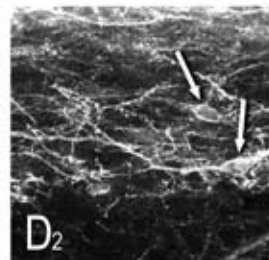
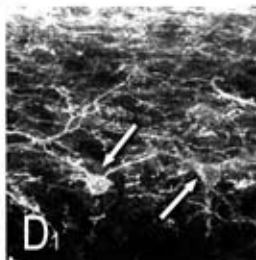
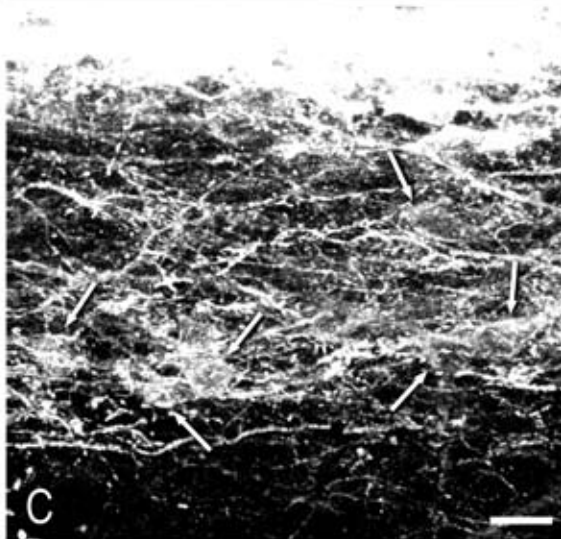
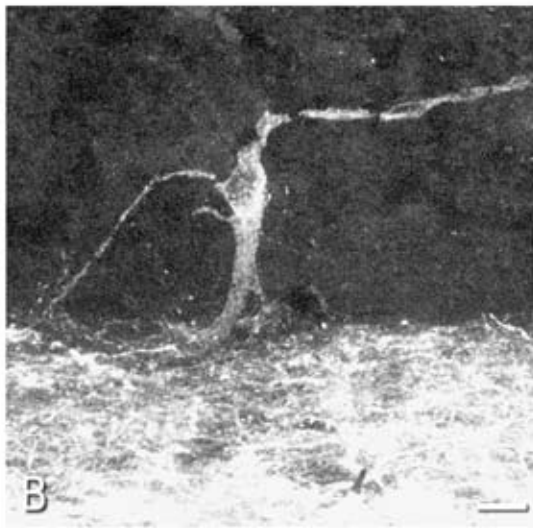
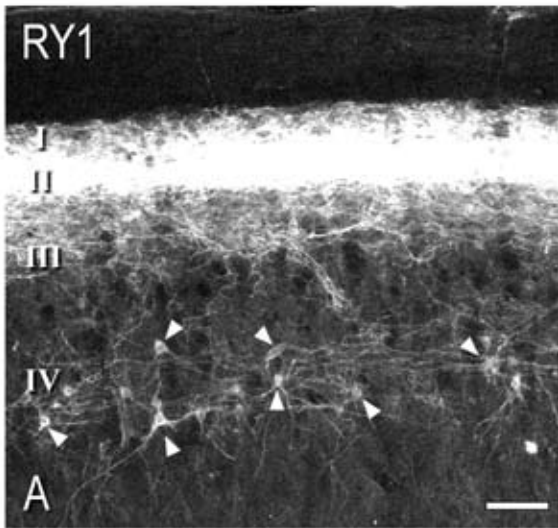
**Fig. X.5.** Microfotografías de fluorescencia confocal (A, B, E-F'), campos oscuro (C) y claro (D) mostrando cortes sagitales (A, B, E-F') y transversales (C, D) del asta dorsal de la médula espinal de rata, teñidas con el anticuerpo contra el RY1 (A, B, E-F'), o hibridadas con una sonda complementaria al ARNm del RY1 (C, D). En A, se muestra una mezcla de 17 imágenes ópticas de 1µm de espesor, de una neurona RY1-IR presente en láminas profundas del asta dorsal. En B, se muestra la misma neurona por mezcla de 5 imágenes a la altura del perfil nuclear. En C, a la expresión del ARNm del RY1 en láminas superficiales del asta dorsal (entre las líneas punteadas), se agrega la presencia del receptor en algunas neuronas profundas (cabeza de flecha). En D, la neurona indicada en C (cabeza de flecha) se muestra luego de la contratinción con azul de toluidina. Compárese el patrón de tinción del RY1 en neuronas de láminas superficiales del astas dorsal (E-F'), con el de láminas más profundas (A, B) (E: sección de 1 µm; F, mezcla de 9 imágenes de 1 µm cada una; F': mezcla de 3 imágenes). Barras de calibración: 10 µm en F' (aplica a A, B; F, F'); 10 µm en D (aplica a C); 25 µm para D; 10 µm para (E).

**Fig. X. 5.** Immunofluorescence confocal (A, B, E-F'), and dark (C) and bright (D) field micrographs of sagittal (A, B, E-F') and transverse (C, D) sections of the dorsal horn of the rat spinal cord, stained with Y1R antiserum (A, B, E-F'), or hybridized with a probe complementary to Y1R mRNA (C, D). A is a composite of 17 optic images, each of 1 µm thickness, of a Y1R-IR neuron present in the deep laminae. In B, the same neuron is shown by merging 5 images through its nucleus. In C, along with the Y1R mRNA expression seen in superficial laminae of the dorsal horn (between dashed lines), a neuron can be seen in the laminae V (arrowhead). In D, the same neuron as in C (arrowhead) is shown after counterstaining with toluidine blue. E-F' are shown for comparison with A, B, contrasting the expression in lamina I-II versus lamina III-V (E: 1 µm image; F: 9, 1 µm merged images; F': 3, 1µm merged images). Calibration bars: 10 µm in F' (applies to A, B; F, F'); 10 µm in D (applies to C); 25 µm for D; 10 µm for (E).

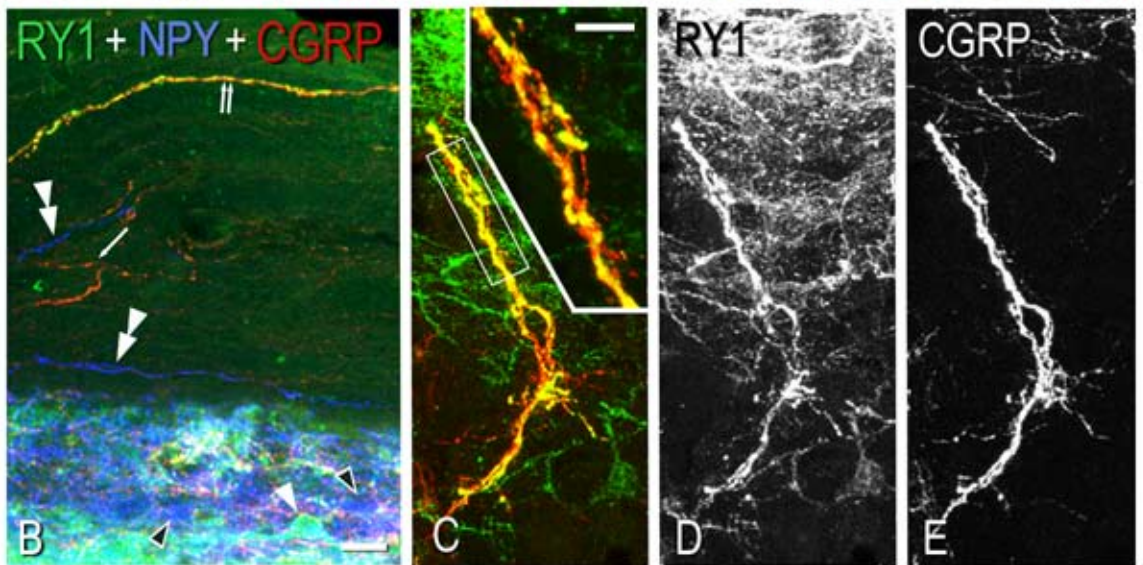
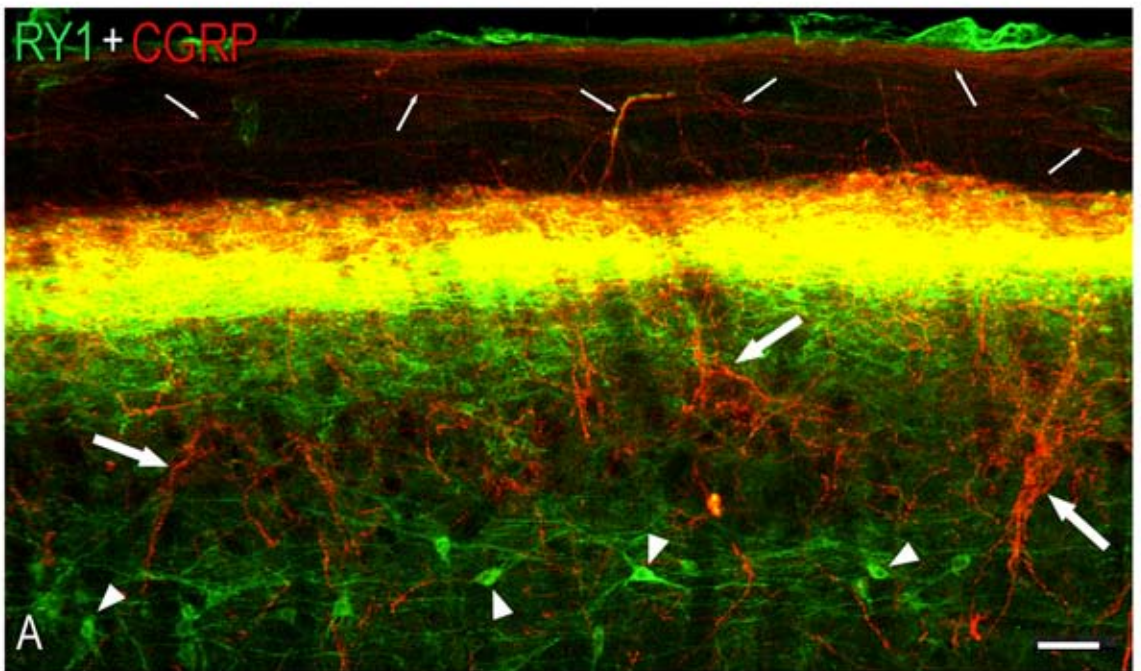
**Fig. X.6.** Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando cortes sagitales del asta dorsal de la médula espinal de rata, teñidas con el anticuerpo contra el RY1 (verde) y CGRP (rojo), pasando por el área del canal central. En A, se muestra una sección del canal central en el que es posible observar la presencia de varios cuerpos neuronales RY1-IR (cabezas de flecha). Además se observa la abundante expresión de CGRP en fibras presentes en el área (flecha grande), a veces acompañadas de numerosas fibras RY1-IR (flecha grande abierta). Se aprecian proyecciones RY1-IRs transversales (flechas pequeñas simples) y longitudinales (flechas pequeñas dobles). Asimismo, se observa un componente de fibras RY1-IR de dirección longitudinal ubicadas a todo lo largo de la sección a los lados del canal central (flechas pequeñas triples), las cuales parecen colocalizar CGRP. En una mirada más cercana (B, C), se observa que, en realidad, este último se trata de un componente fibroso RY1-IR grueso (en verde), al que se le asocian fibras CGRP-IR (en rojo) (flechas pequeñas) (C). Barra de calibración: 100  $\mu\text{m}$  para (A); 33  $\mu\text{m}$  para (B); 8  $\mu\text{m}$  para (C).

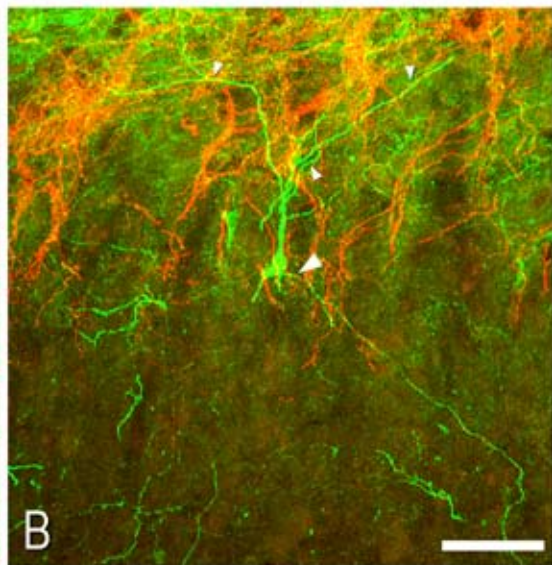
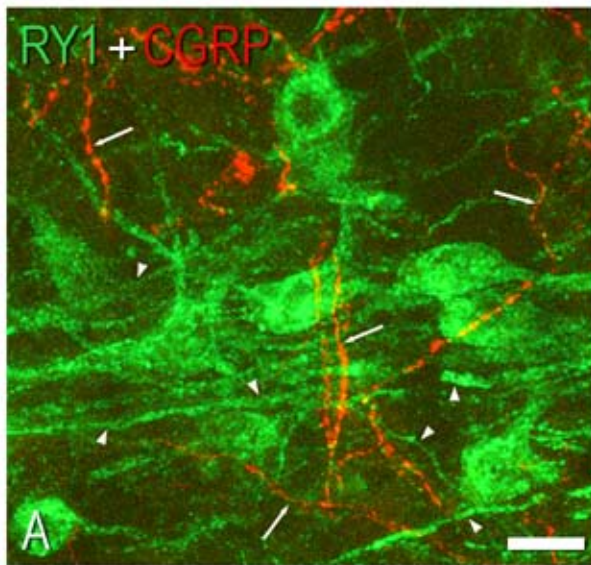
**Fig. X. 6.** Immunofluorescence confocal micrographs of sagittal sections of the dorsal horn of the rat spinal cord through the central canal, and stained with the Y1R (green) and CGRP (red) antisera. In A, a section of the central canal is shown, where several Y1R-IR NPs are seen (arrowheads). Also, several CGRP-IR fibers are observed in the area (large filled arrow), many of which enter the zone as thick nerve bundles along with Y1R-IR fibers (large open arrow). Some transversal (single small arrows) and longitudinal (double small arrows) Y1R-IR fibers are seen. Moreover, Y1R-IR longitudinal fiber bundles are seen besides the central canal (triple small arrows), which seem to colocalize CGRP. A closer look to these bundles (B, C) shows that, in fact, these bundles are formed by a thick Y1R-IR fibrous formation (green), with which CGRP-IR fibers (red) sometimes are associated (small arrows). Calibration bar: A: 100  $\mu\text{m}$ ; B: 33  $\mu\text{m}$ ; C: 8  $\mu\text{m}$ .

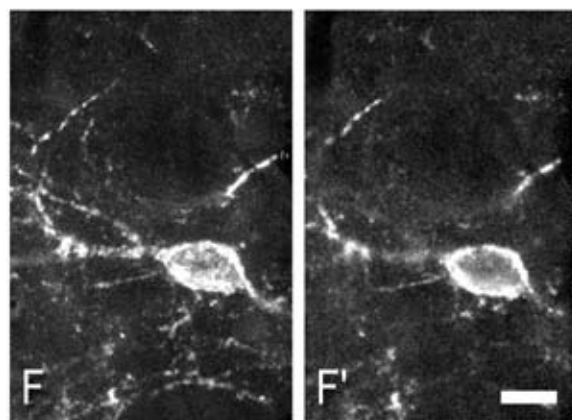
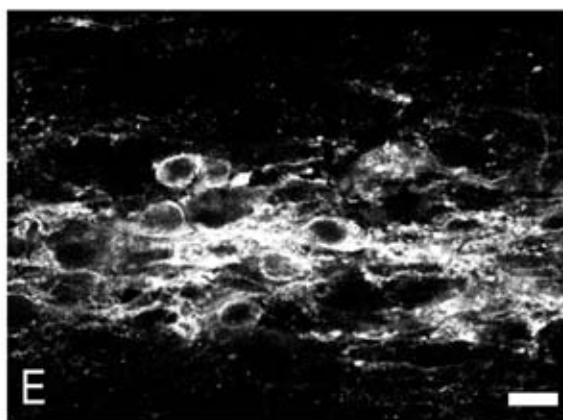
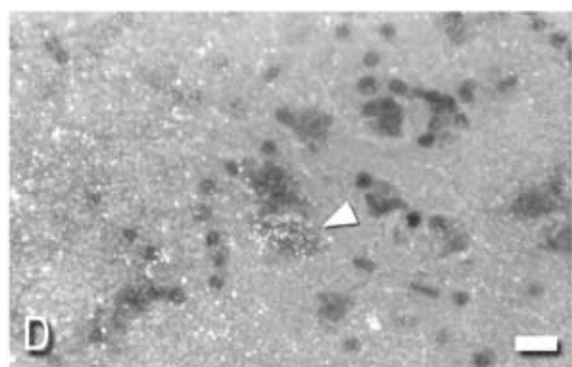
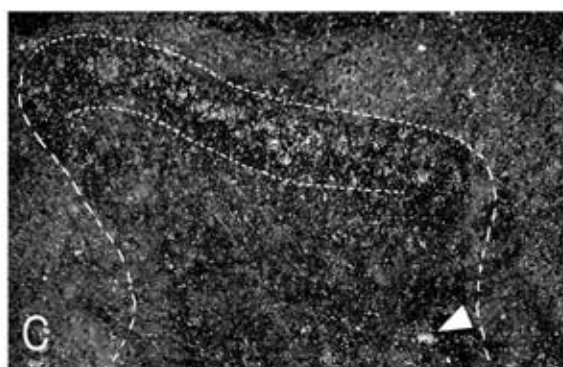
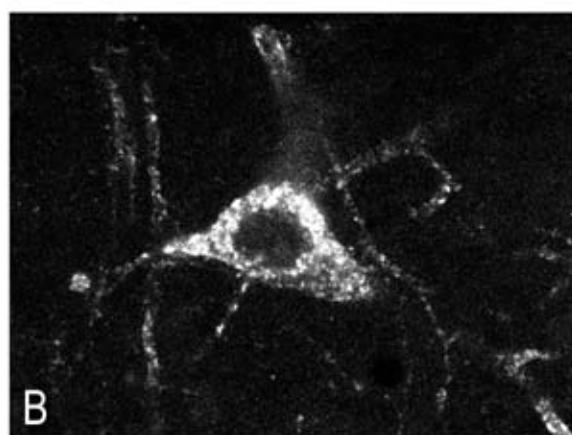
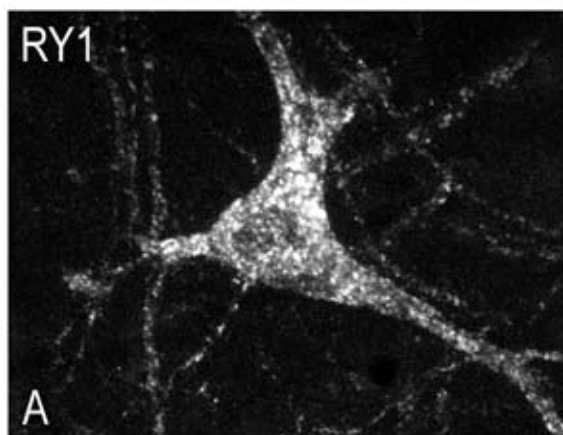




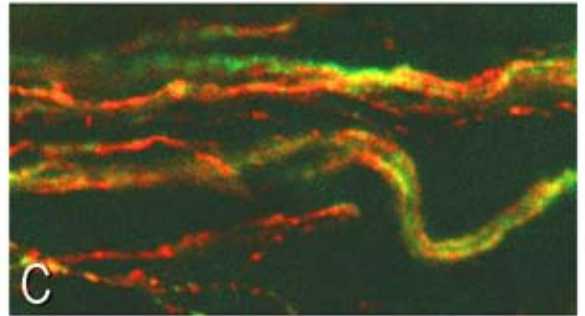
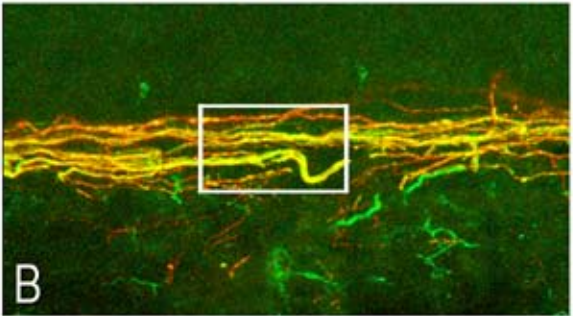
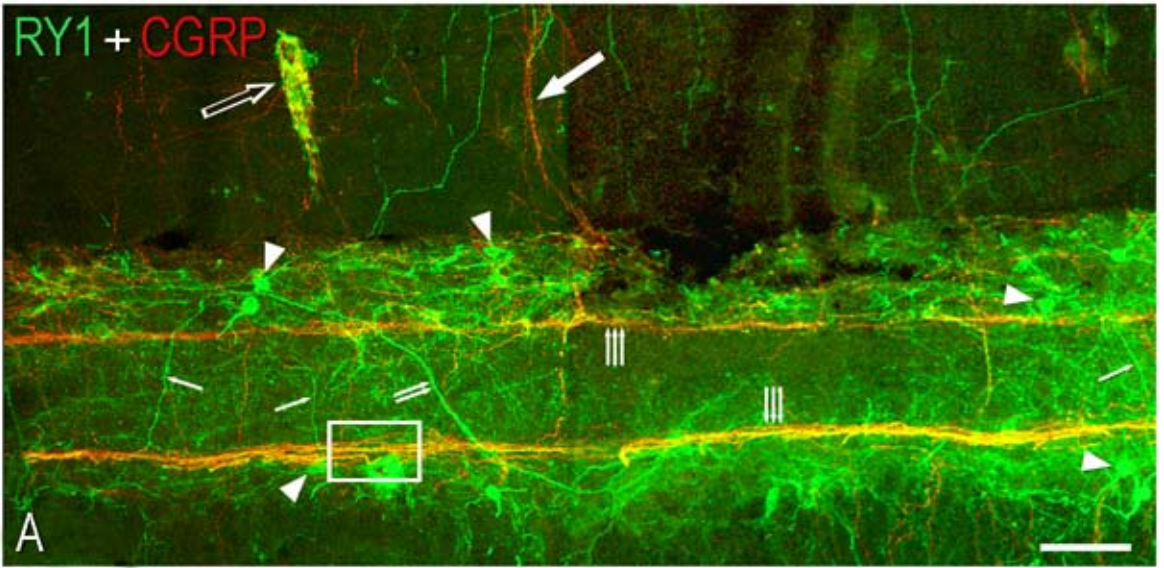












# Referencias

# Referencias