

**Transmisores Peptidérgicos y Gaseosos
en la Regulación Periférica
del Dolor Neuropático.
Moduladores Celulares y Moleculares.**

María Florencia Coronel

Director de tesis: Prof. Dr. Marcelo José Villar



Facultad de Ciencias Biomédicas
Universidad Austral
Pilar, Argentina
2007

Índice

Agradecimientos	5
Publicaciones	9
Abreviaturas	11
Prólogo	15
Introducción	17
Dolor neuropático: definición y características generales	19
Un poco de historia	20
Etiología	23
Características clínicas del dolor neuropático	29
Fisiología del dolor: vías de conducción y mediadores involucrados	33
Fisiopatología y mecanismos moleculares del dolor neuropático	42
Mecanismos periféricos	43
Mecanismos centrales	46
Neuropéptidos y neuromoduladores	49
Neuropéptido Y	50
Galanina	55
Óxido nítrico	59
Tratamiento del dolor neuropático	66
Células estromales de médula ósea	69
Oligonucleótidos inmunomoduladores	73
Objetivos	77
Generales	79
Proyecto 1	80
Proyecto 2	82
Proyecto 3	84
Proyecto 4	86
Proyecto 5	89
Diseño experimental	93
Proyecto 1	95
Proyecto 2	96

Proyecto 3	97
Proyecto 4	98
Proyecto 5	102
Materiales y Métodos	105
Animales de experimentación	107
Modelos de lesión	107
Aislamiento, cultivo, cosecha y administración de CEMO	109
Oligonucleótido IMT504	111
Conducta nociceptiva	112
Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e inmunocitoquímica	113
Microscopía y cuantificación	117
Determinación de nitritos y nitratos	119
Western Blot	120
Determinación de proteínas	122
Análisis estadístico de los resultados	123
Resultados	125
Proyecto 1	127
Proyecto 2	131
Proyecto 3	135
Proyecto 4	139
Proyecto 5	151
Discusión	157
Proyecto 1	159
Proyecto 2	163
Proyecto 3	169
Proyecto 4	173
Proyecto 5	179
Conclusiones generales	183
Bibliografía	187

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a mi formación cultural, científica y espiritual, y especialmente a aquellos que compartieron este período de formación y colaboraron con la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. César Bergadá, quien fuera para mí, así como para muchos otros, la puerta de entrada a la Universidad Austral. Gracias por su ejemplo de profesional de excelencia y persona de bien, por su cariño y su amabilidad.

Al Dr. Marcelo Villar, mi Director de Tesis, por introducirme en el campo de la investigación del dolor neuropático, brindarme su experiencia y conocimientos, guiarme y orientarme en este camino. Gracias por alentarme ante los logros positivos, así como ante la adversidad, y por impulsarme siempre hacia metas más superadoras. Por permitirme crecer académica y profesionalmente. Por su apoyo y entusiasmo frente a mis propuestas, su confianza y su generosidad.

A todos los integrantes del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias Biomédicas; a Ángela Suburo, Beatriz Settembrini, Juan Gallo y Guillermo Mazzolini por sus consejos, su interés y su apoyo; a Cristina Defagot, Pablo Brumovsky, Jorge Aquino, Patricia Musolino, Valeria Cantó, Vanesa Torbidoni, María Iribarne, Mauricio Castañeda, Federico Luengo, Jorge Mancini, Emiliano López, Alejandra Camino y Catalina

Atorrasagasti, por compartir el trabajo diario en esta etapa de formación, permitiendo el enriquecimiento mutuo, y especialmente por tantos momentos compartidos, por su alegría, su entusiasmo y su amistad; a Silvina y Gemán Ruffolo, Guillermo Gastón, Soledad Arregui y Rodrigo Guantay por su generosa ayuda, su disponibilidad y su cariño.

A Beatriz Settembrini, Alejandra Chasseing, Alejandro Montaner y Andrés Hernando Insúa, por invitarme a participar en sus proyectos de investigación y brindarme generosamente sus conocimientos contribuyendo a mi crecimiento profesional. Gracias por sus consejos sobre aspectos laborales, profesionales y personales, por su colaboración en la discusión de los resultados presentados en esta Tesis, y por su amistad.

A aquellos que me ayudaron a dar mis primeros pasos en el campo de la investigación básica, especialmente a Silvia Lores Arnaiz, Laura Valdez, Diego Rodríguez Gil y Leonardo Pignataro, por compartir conmigo sus conocimientos y su experiencia. Gracias por su paciencia y su entusiasmo, por orientarme y alentarme.

A todos mis educadores y docentes del Colegio Esclavas del Sagrado Corazón de Jesús y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por contribuir a mi formación espiritual, humana y profesional e inculcarme el amor a Dios, el valor del estudio y el interés por las ciencias.

A los docentes de “Bioquímica”: Ana y Horacio Sancovich, Selva Cigorraga, Guillermo Juvenal, Silvina Creus, Cristina Barbaro, Fernanda Riera, Paula Scaglia, Valeria Fernández Vallone y Nazaret Loreti, por compartir las tareas, preocupaciones y

alegrías de la docencia, y especialmente por su cariño, su amistad, su generosa colaboración y sus consejos siempre oportunos.

A los docentes de “Microbiología”: Néstor Jacob, Cecilia Freire, José Luis Valenti, Mercedes Rojas, Viviana Vilches y Gloria Pineda, por su ejemplo de profesionales de excelencia, por compartir conmigo el maravilloso mundo de la Microbiología, y especialmente por su cariño, su confianza y su apoyo.

A todo el personal permanente de la Facultad de Ciencias Biomédicas, especialmente a las integrantes del Departamento de Educación: Alejandra Blanco, Cecilia Primogerio y Laura LLull; a las bibliotecarias Carla Raggianti y Liliana Díaz; a las secretarias: Fernanda Valdesolo, Marina Sundblad, Ángeles Schlegel, Graciela Tenreyro, Amelia Cabrera, Soledad Márquez, Verónica Schneider y Vanesa Fernández; a los integrantes del Departamento de Administración: Matías Arrese, Pablo Gutiérrez, Francisco Oliva, Mariano Díaz de Vivar y Pablo Lanús. A todos ellos, gracias por su disponibilidad y su colaboración en las más variadas tareas. Gracias su permanente sonrisa, por tantos momentos compartidos, por enriquecer el día a día y por su amistad sincera.

A tantos otros integrantes de la Facultad de Ciencias Biomédicas que han sido modelos a seguir, educadores y consejeros, especialmente a los Doctores Rodolfo Martín, Raúl Valdez, Gustavo Amestoy, Leonardo McLean, Ángel Centeno, y los Presbíteros Gustavo Páez y Fernando Miguens.

Al Dr. Alejandro Consigli, Rector de la Universidad Austral, al Dr. Ricardo Crespo, Director de Investigación de la Universidad, y a los miembros del Consejo de Dirección de la Facultad de Ciencias Biomédicas: Juan Gallo, Soledad Campos, Gretel Desmery y Edgardo Narbais, por su permanente interés, su apoyo y su generosidad. Gracias a la Universidad Austral por brindarme el espacio físico e institucional donde desarrollar mi actividad científica y académica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina, por darme el entorno científico y el sustento económico para realizar mi Doctorado.

A toda mi familia. A los mayores junto a quienes crecí y compartí un entorno familiar humano y cristiano, y que han sido grandes ejemplos a seguir: mis bisabuelos Héctor y Nora Viecca, Ana María Zaputovich y Angélica Ibáñez, mis abuelos Nora y Gaspar Zaputovich, Suley y Jaime Coronel, mis padres Adriana y Guillermo Coronel. Gracias por educarme en el amor a Dios y al prójimo, por inculcarme el valor del esfuerzo, la dedicación al estudio, el interés por las ciencias y la pasión por la docencia. A mis hermanos Pilar y Gonzalo, por crecer unidos, por compartir cada etapa ayudándonos mutuamente, por su alegría y entusiasmo. Y especialmente, a mi esposo Gonzalo Abad, y mi hijo Juan Manuel, por su amor, su apoyo incondicional, su contención y su paciencia. Por comprender mis ausencias, esperarme siempre con una sonrisa y los brazos abiertos y ser el motor que me impulsa a seguir siempre adelante.

Publicaciones

Esta Tesis se basa en los siguientes trabajos:

“Nitric oxide production in rat dorsal root ganglia and spinal cord after sciatic nerve lesion”. M.F. Coronel, M.C. Defagot, P.L. Musolino and M.J. Villar. Journal of Neuropathic Pain and Symptom Palliation 1:3-9 (2005).

“Nerve degeneration is prevented by a single intraneural apotransferrin injection into colchicine-injured sciatic nerves in the rat”. J.B. Aquino, P.L. Musolino, M.F. Coronel, M.J. Villar and C.P. Setton-Avruj. Brain Research 1117:80-91 (2006).

“Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction”. M.F. Coronel, P.L. Musolino and M.J. Villar. Neuroscience Letters 405:5-9 (2006).

“Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction”. P.L. Musolino, M.F. Coronel, T. Hökfelt and M.J. Villar. Neuroscience Letters 418:97-101 (2007).

“Differential galanin upregulation in dorsal root ganglia and spinal cord after graded single ligature nerve constriction of the rat sciatic nerve”. M.F. Coronel, P.R. Brumovsky, T. Hökfelt and M.J. Villar. Journal of Chemical Neuroanatomy (aceptado)

Julio 2007, en prensa).

“Bone marrow stromal cells induce changes in NPY, galanin and Y₁ receptor expression after sciatic nerve constriction”. M.F. Coronel, P.L. Musolino, P.R. Brumovsky, T. Hökfelt and M.J. Villar. *Neuropeptides* (enviado).

“Oligonucleotide IMT504 prevents mechanical and thermal allodynia in rats subjected to a sciatic nerve crush”. M.F. Coronel, A. Hernando-Insúa, J.M. Rodríguez, F. Elías, J. Zorzópulos, A.N. Chasseing, A.D. Montaner and M.J. Villar (en preparación).

Abreviaturas

A	adenina
AC	adenilato ciclasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMP _C	forma cíclica del nucleótido adenosina monofosfato
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	análisis de la varianza
APS	sociedad americana de dolor
ATP	trifosfato de adenosina
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	seroalbúmina bovina
C	citosa
CEMO	células estromales de médula ósea
CFU-Fs	unidades formadoras de colonias de fibroblastos
CGRP	peptido relacionado al gen de calcitonina
CMA	compresión mecánica aguda
CMH	células madre hematopoyéticas
CMM	células madre mesenquimáticas
CMN	células mononucleares
CMN-H	células mononucleares de linaje hematopoyético
CUNP	compresión única del nervio periférico
DABCO	1,4-diaza-biciclo-octano
EDRF	factor de relajación derivado del endotelio
eNOS	isoforma endotelial de la sintasa de óxido nítrico
FAD	dinucleótido de flavina adenina
FITC	iso-tio-cianato de fluoresceína
FMN	mononucleótido de flavina
G	guanina
GABA	ácido γ -amino butírico

GalR	receptor de galanina
GARDs	ganglios anexos a la raíz dorsal
GC	guanilato ciclasa
GFAP	proteína acídica fibrilar glial
GMP _C	forma cíclica del nucleótido guanosina monofosfato
GTP	trifosfato de guanosina
IASP	asociación internacional para el estudio del dolor
i.g.	intraganglionar
IL-1	interleuquina-1
iNOS	isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico
IP ₃	inositol trifosfato
IR	inmunoreactivas/os
L	lumbar
L _B	linfocitos B
L-NAME	metilester de N-nitro-L-arginina
L-NMMA	N-mono-metil-L-arginina
L _{Th1}	linfocitos T helper 1
MAG	glicoproteína asociada a la mielina
MAPKs	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MBP	proteína básica de mielina
MCP-1 α	proteína quemoattractante de monocitos 1 α
N	nucleótido
NADPH	fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina
NGF	factor de crecimiento neural
NK	neuroquinina
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	isoforma neuronal de la sintasa de óxido nítrico
NNT	número necesario a tratar
NO	óxido nítrico
NOS	sintasa de óxido nítrico
NO _x	óxidos de nitrógeno

NPY	neuropéptido Y
NT-3	neurotrofina 3
ODNs	oligodeoxinucleótidos
PBS	buffer fosfato salino
PGP 9.5	producto proteico del gen 9.5
PK _A	proteína quinasa A
PK _C	proteína quinasa C
PK _G	proteína quinasa G
PL _C	fosfolipasa C
Py	pirimidina
SDF-1	factor derivado de células estromales 1
SDRC	síndrome doloroso regional complejo
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
SF	solución fisiológica
SFN	sociedad de neurociencias
T	timina
THB	tetrahidrobiopterina
TNF α	factor de necrosis tumoral α
TRP	receptor de potencial transiente
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana

Prólogo

El dolor neuropático es un dolor crónico, severo y sumamente incapacitante que se produce como consecuencia de una lesión o disfunción del sistema nervioso periférico o central. El dolor neuropático permanece aún resuelto el daño que le dió origen y es refractario a los tratamientos farmacológicos disponibles hasta el momento. De ahí el interés en profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en su génesis, y en el diseño de nuevas alternativas terapéuticas.

En la presente Tesis se estudiaron distintos modelos animales de dolor neuropático, evaluando la participación de transmisores peptidérgicos y gaseosos en la neurotransmisión del dolor, así como el efecto de la administración de terapias celulares y moleculares sobre la conducta nociceptiva de los animales.

En todos los modelos evaluados la lesión desencadenante se localizó en el nervio ciático. El mismo está constituido en su porción sensitiva por las proyecciones periféricas de las neuronas aferentes primarias, alojadas en los ganglios raquídeos. Estas neuronas constituyen la primera estación en las vías de conducción del dolor y se encargan de transmitir la información dolorosa a la médula espinal (desde allí la información asciende hacia centros superiores). Son varios los neuropéptidos y neuromoduladores involucrados en la neurotransmisión nociceptiva. Nuestros estudios se centraron en los neuropéptidos tirosina y galanina, y en el neuromodulador gaseoso óxido nítrico, evaluando sus niveles de expresión en las neuronas aferentes primarias y en la médula espinal lumbar de

animales controles o sometidos a una lesión periférica. Los resultados obtenidos muestran el alto grado de plasticidad de las neuronas aferentes primarias, que responden a la injuria modificando la expresión de los distintos mediadores. Nuestros resultados, sumados a los datos de la bibliografía internacional, nos han permitido aclarar los roles que estos mediadores juegan en la neurotransmisión del dolor.

Las células madre obtenidas de individuos adultos están siendo evaluadas pensando en su posible aplicación para el tratamiento de injurias del sistema nervioso y de enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, evaluamos la participación de las células estromales de médula ósea (CEMO), fracción celular que contiene células madre mesenquimáticas (CMM), en animales con dolor neuropático. Las CEMO fueron aisladas a partir de punciones de médula ósea de rata, multiplicadas *in vitro* y administradas por vía intraganglionar o intravascular a animales con lesión de su nervio ciático. También se indujo la proliferación y la movilización de las CMM endógenas de los animales lesionados mediante la administración del oligonucleótido IMT504. Los resultados obtenidos fueron sumamente interesantes ya que muestran la migración de las CEMO específicamente a los sitios de injuria, la prevención del desarrollo de conductas asociadas al dolor neuropático como la alodinia mecánica y térmica y la modificación de los niveles de expresión de neuropéptidos y neuromoduladores en las neuronas aferentes primarias.

Los resultados aquí presentados permiten profundizar en el conocimiento de los mediadores involucrados en la neurotransmisión nociceptiva, y aportan datos originales sobre posibles alternativas terapéuticas.

Introducción

Dolor neuropático: definición y características generales

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), define al dolor neuropático como aquel dolor causado por una lesión o disfunción del sistema nervioso, ya sea periférico o central (Merskey and Boduk, 1994). Es un dolor de tipo crónico, que puede permanecer aún resuelto el daño que le dió origen. Es severo, sumamente incapacitante (Meyer-Rosenmberg et al., 2001) y refractario al tratamiento con analgésicos (Orza et al., 2000).

Es importante diferenciar el dolor nociceptivo, también llamado “fisiológico”, del dolor neuropático o “patológico” (Merskey, 1994, Merskey and Boduk, 1994, Wiertelak et al., 1994, Millan, 1999). El dolor nociceptivo es la respuesta normal del organismo ante una injuria. Se trata de una respuesta aguda a un estímulo doloroso, ya sea mecánico, térmico o químico, y resulta de la activación de un grupo especial de fibras aferentes primarias, aquellas asociadas a los “receptores del dolor” o nociceptores (Merskey and Boduk, 1994, Millan, 1999). El dolor nociceptivo constituye un importante mecanismo adaptativo, una señal de alarma que protege al individuo frente a daños mayores. El dolor neuropático, por el contrario, es una respuesta anormal e implica cambios en la fisiología de la conducción de la información nociceptiva (Merskey and Boduk, 1994, Millan, 1999). No es una señal de un peligro inminente, sino que constituye una respuesta prolongada en el tiempo a un daño pasado (Merskey and Boduk, 1994).

Existen dos clases diferentes de dolor de tipo persistente o crónico (Merskey and Boduk, 1994). El dolor inflamatorio, que es el dolor espontáneo que se produce cuando

la piel u otros tejidos se encuentran inflamados, y el dolor neuropático que se genera, como dijimos anteriormente, cuando existe una lesión o disfunción del sistema nervioso periférico o central (Merskey and Boduk, 1994). Como consecuencia de la injuria, se inducen cambios en las propiedades de las diferentes poblaciones neuronales que intervienen en la neurotransmisión nociceptiva (Millan, 1999). Estos cambios, que se conocen con el nombre de procesos de sensibilización periférica y central (se explican más adelante), se traducen en distintas alteraciones de la nocicepción (Millan, 1999). De este modo, los pacientes con dolor neuropático manifiestan, por ejemplo, dolor espontáneo (dolor en ausencia de estímulo), alodinia (dolor producido por estímulos normalmente no dolorosos) e hiperalgesia (dolor exacerbado inducido por estímulos dolorosos de baja intensidad), entre otras alteraciones del sensorio (Millan, 1999, Scadding, 1999).

Un poco de historia

Antes de introducirnos en la anatomía, la fisiología y la patología de la nocicepción, resulta interesante recordar algunos aspectos en la historia del dolor neuropático.

En 1864, el Doctor Silas Weir Mitchell describió los primeros cuadros documentados de dolor neuropático, en heridos de la Guerra Civil Americana. Mitchell, médico a cargo del Hospital Militar de Filadelfia, tuvo la oportunidad de atender numerosos soldados con heridas de bala y otras lesiones de nervios periféricos, y desarrolló una extensa investigación en el área neurológica. En su trabajo “Heridas de bala y otras lesiones de nervios” (*Gunshot Wounds and Other Injuries of Nerves*, 1864), describe por primera vez este síndrome, al que denomina “causalgia”. En 1872 publica otro libro,

“Lesiones de nervios y sus consecuencias” (*Injuries of Nerves and Their Consequences*), donde amplía la descripción de los casos, haciendo referencia incluso a los desordenes psiquiátricos desencadenados por la amputación de un miembro, dándoles la denominación de “síndrome de miembro fantasma”.

Desde estas primeras descripciones, el espectro de cuadros clínicos asociados al dolor neuropático se ha ido incrementando progresivamente. Hoy en día, hablar de dolor neuropático es referirse a un número sustancial de cuadros clínicos de muy diverso origen. Así como la etiología, la fisiopatología y la semiología de estos cuadros varían considerablemente, por lo que el pronóstico y el tratamiento también cambian. Es por esto que tanto investigadores de las ciencias básicas, como médicos clínicos se han abocado al estudio del dolor neuropático.

El desarrollo de modelos animales de dolor neuropático permitió profundizar en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la generación y el mantenimiento del dolor. El primer modelo fue descrito por Wall y cols. en 1979, y conlleva la sección completa del nervio ciático (Wall et al., 1979). Este modelo contribuyó de forma notable al conocimiento de las alteraciones que se producen en individuos con amputaciones traumáticas de extremidades o sección nerviosa, y constituye el correlato experimental del síndrome de miembro fantasma. En 1988, Bennett y Xie describieron un nuevo modelo de dolor neuropático generado por la colocación de cuatro ligaduras alrededor del nervio ciático de la rata (Bennett and Xie, 1988). Este modelo se conoce con el nombre de “injurio por constricción crónica” y es actualmente uno de los más utilizados en el campo de la investigación del dolor neuropático. Al desarrollo de estos primeros

modelos animales, siguieron muchos otros, como el de ligadura parcial del nervio ciático descrito por Seltzer y cols. (Seltzer et al., 1990), el de ligadura de nervios espinales diseñado por Kim y Chung (Kim and Chung, 1992), y el de compresión estandarizada del nervio ciático utilizando un tubo de polietileno descrito por Mosconi y Kruger (Mosconi and Kruger, 1996). Posteriormente, se fue ampliando el campo de estudio, pasando de lesiones mecánicas o traumáticas como las hasta ahora descritas, a injurias de etiología metabólica (neuropatía diabética por administración de estreptozotocina) (Ahlgren and Levine, 1993), tóxica (neuropatía por vincristina) (Authier et al., 1999) o inflamatoria (neuropatía por la administración local del adyuvante de Freund) (Eliav et al., 1999), por citar algunos ejemplos.

Los estudios con modelos animales han derivado en el conocimiento fisiopatológico de la repercusión anatómica, funcional y molecular de las lesiones nerviosas. Si bien el conocimiento que tenemos del dolor neuropático ha mejorado sustancialmente en los últimos años, todavía continúa siendo una patología desafiante para la comunidad científica en lo relativo al apropiado manejo de la enfermedad.

El dolor neuropático constituye uno de los problemas de salud más comunes y destacados, siendo una causa de sufrimiento importante en pacientes con dolor crónico. El deterioro que el dolor neuropático ocasiona en el estado de salud general y en la calidad de vida de los pacientes es devastador. En la Figura 1 se muestran algunas obras de arte realizadas por pacientes con dolor crónico, en las que representan alguna faceta de su cruel malestar y el impacto que este tiene en sus vidas. Las mismas fueron realizadas en el marco de un proyecto denominado “Arte y dolor” organizado por la Sociedad

Americana de Dolor (APS, *American Pain Society*), y son un reflejo fiel del sufrimiento y la desesperación que el dolor genera en estas personas.

Se estima que en la actualidad la prevalencia del dolor neuropático oscila entre el 5% y el 7.5% en la población adulta de Europa (datos de la IASP), y que ocasiona hasta el 25% de las consultas en las clínicas de dolor. Según datos estadísticos de los Estados Unidos, el 18% de la población de ese país padece dolor neuropático. En Argentina, se calcula que 1.8 millones de personas padecen esta condición, de los cuales la mayoría desconoce el origen del dolor (datos de Pfizer Argentina).

Etiología

Tradicionalmente se ha clasificado al dolor neuropático en periférico o central (Jensen et al., 2001, Dworkin, 2002), teniendo en cuenta la localización anatómica de la lesión o disfunción nerviosa. Sin embargo, entidades como la diabetes, el alcoholismo, el efecto de fármacos y otras comorbilidades, no se circunscriben a un sitio específico. De todas formas, y por una simple cuestión didáctica, hemos agrupado a las posibles etiologías del dolor neuropático utilizando la clasificación tradicional.

Algunos de los síndromes de dolor neuropático de origen periférico se citan a continuación:

- Neuropatía diabética: La diabetes es la patología de origen metabólico de mayor incidencia a nivel mundial y la neuropatía diabética es la complicación

más frecuentemente asociada a la diabetes, con una prevalencia que oscila entre el 20 y el 30% en las distintas poblaciones (Harris et al., 1993, Tesfaye et al., 1996, Cabezas-Cerrato, 1998). El desarrollo de neuropatía se asocia con varios factores predisponentes como la edad avanzada, el largo tiempo de duración de la diabetes, el deficiente control metabólico, la presencia de cetoacidosis severa y de enfermedad cardiovascular, entre otros (Teskfaye et al., 1996, Cabezas-Cerrato, 1998). La condición de hiperglucemia, hiperlipemia e hipoinsulinemia conduce a un aumento del estrés oxidativo y de los procesos autoinmunes, provocando una progresiva desmielinización y pérdida axonal (Teskfaye et al., 1996). La neuropatía diabética es una neuropatía longitud-dependiente, es decir, los axones más largos son los más vulnerables. Los pacientes reportan frecuentemente dolor quemante en pies y dedos (Harris et al., 1993, Dyck et al., 2000). También presentan, paradójicamente, disminución de la sensibilidad al dolor (Harris et al., 1993, Dyck et al., 2000).

- Neuralgia post herpética: El herpes zoster y la neuralgia post herpética son consecuencia de la reactivación del virus varicela zoster que permanece en estado latente en los ganglios raquídeos luego de producir un cuadro de varicela (Nurmikko, 1995, Weaver, 2007). Esta reactivación se asocia generalmente a situaciones de inmunosupresión (Schmader, 2007, Weaver, 2007). Aproximadamente el 20% de los pacientes con herpes zoster desarrollan neuralgia (Schmader, 2007, Weaver, 2007). El zoster cursa con vesículas presentes en el área inervada por uno o más nervios espinales (Nurmikko, 1995). El dolor que permanece de 1 a 3 meses luego de la resolución del exantema se considera signo indicativo del desarrollo de neuralgia post herpética (Nurmikko, 1995, Weaver, 2007). La alodinia es una de las

manifestaciones características de esta neuralgia, que generalmente es autolimitada: sólo el 25% de los pacientes que la sufren siguen refiriendo dolor 6 meses después de la manifestación cutánea (Nurmikko, 1995, Schmader, 2007). Sin embargo, el virus puede causar atrofia del asta dorsal de la médula espinal, pérdida de neuronas aferentes primarias y fibrosis.

- Neuropatía sensitiva por VIH: A la posible invasión viral de las neuronas sensitivas e infiltración macrofágica de los nervios periféricos inducida por el virus, se suma la neurotoxicidad de los fármacos utilizados en la terapia antirretroviral (Hewitt et al., 1997, Moyle and Gazzard, 1999, Verma et al., 2004). Alrededor del 30-40% de los pacientes infectados con el VIH desarrolla neuropatía periférica (Hewitt et al., 1997, Lebovits et al., 1998). Los patrones de afectación son diversos, pero el más frecuente es la neuropatía simétrica distal que cursa con parestesias dolorosas en miembros inferiores, disminuyendo en forma significativa la calidad de vida de estos pacientes (Verma et al., 2004).
- Neuropatía post quirúrgica: Se encuentra asociada a amputaciones (síndrome del miembro fantasma), toracotomías, mastectomías (Wallace et al., 1996, Smith et al., 1999) y esternotomías (Kalso et al., 2001, Alston and Pechon, 2005). El 40-50% de los pacientes que han sufrido una esternotomía, por ejemplo en el contexto de una cirugía cardíaca a cielo abierto, desarrollan dolor neuropático (Alston and Pechon, 2005). El síndrome doloroso post mastectomía afecta a un 5-20% de las mujeres sometidas a diversos procedimientos quirúrgicos de mama (Smith et al., 1999). Suele ocurrir inmediatamente después de la cirugía, y a menudo se cataloga de enfermedad

psicológica (Wallace et al., 1996). Probablemente se deba al daño de los nervios intercostales o intercostobraquiales (Wallace et al., 1996).

- Neuralgia del trigémino: Es la neuralgia facial de mayor frecuencia de presentación y es considerada uno de los cuadros más dolorosos (Edlich et al., 2006). En la mayoría de los casos, esta neuralgia se produce por compresión, generalmente vascular, del nervio trigémino en la zona de entrada al encéfalo. Sin embargo, en algunos casos se origina por una patología desmielinizante (Elías and Burchiel, 2002, Edlich et al., 2006). Produce severos ataques de dolor en el área facial, que se presentan como un dolor agudo, lancinante, paroxístico, eléctrico y de corta duración (Edlich et al., 2006).

- Radiculopatías: Pueden ser de localización cervical, torácica o lumbosacra. Dentro de las causas de radiculopatías se encuentran la herniación discal, la estenosis raquímedular y el síndrome de pinzamiento nervioso secundario a espondilosis hipertrófica (Freynhagen et al., 2007). La hernia del disco intervertebral es la causa más frecuente y produce compresión de la raíz de los nervios espinales (Freynhagen et al., 2007).

- Neuropatía relacionada al cáncer: Puede ocurrir compresión o infiltración tumoral, o injuria nerviosa relacionada a la radioterapia o a la quimioterapia (Chang et al., 2006). Se ha descrito que algunos fármacos antineoplásicos como la vincristina (Authier et al., 1999), el cisplatino (Authier et al., 2003) y el paclitaxel (Polomano et al., 2001) pueden causar neuropatías, constituyendo un factor limitante para el empleo de tales medicamentos en clínica humana.

- Neuralgias postraumáticas: Se estima que alrededor del 5% de los pacientes con injuria nerviosa traumática sufren dolor neuropático (Sunderland, 1993).

- Síndrome doloroso regional complejo (SDRC): Se caracteriza por presentar dolor regional de predominio distal y cambios en la sensibilidad en el área afectada por una injuria, excediendo en magnitud y duración el curso clínico esperado del incidente inicial, y ocasionando con frecuencia un deterioro motor importante (Ribera, 2003). Se acompaña de disfunción vasomotora que origina edemas y cambios en el color, la temperatura y la sudoración de la piel (Ribera, 2003). Existen dos tipos de SDRC, el tipo I corresponde al anteriormente denominado “síndrome de distrofia simpática refleja”, es característicamente causado por el trauma o la inmovilización de un miembro, pero no presenta una lesión nerviosa definida (Stanton-Hicks et al., 1995, Ribera, 2003). El tipo II, antiguamente denominado “causalgia”, es similar en su presentación pero incluye aquellos casos en los que sí existe una lesión nerviosa definida (Stanton-Hicks et al., 1995, Ribera, 2003).

- Causalgia: Síndrome descrito por primera vez en heridos de la Guerra Civil Americana por el Doctor Silas Weir Mitchell, médico a cargo de un hospital para personal militar con patologías neurológicas (Mitchell, 1867). Posteriormente fue descrito en soldados de la Segunda Guerra Mundial con lesiones en las extremidades producidas por misiles (Schwartz, 1951, Kuenkel, 1952, Jaeger, 1957). Actualmente se lo incluye dentro del SDRC de tipo II (Ribera, 2003). Incluye importante edema, alteraciones autonómicas profundas (sudoración anormal y cambios en la

temperatura de la piel) y dolor devastante. El dolor causálgico se define como espontáneo, ardiente, intenso y persistente, con tendencia a provocar cambios profundos en la salud psíquica del paciente (Ribera, 2003).

- Neuropatías por compresión o entrapamiento: Son mononeuritis que ocurren en los lugares comunes de compresión neural, como ser a nivel de los nervios facial, mediano, cubital, radial, obturador, femoral y cutáneo lateral del muslo (England, 1999, Corwin, 2006). En pacientes con artritis reumatoidea, los nervios mediano y tibial posterior se encuentran frecuentemente involucrados a nivel del túnel carpiano y del túnel tarsiano (England, 1999, Corwin, 2006).
- Polineuropatías de diversa etiología: Pueden ser hereditarias, asociadas a síndromes de déficit nutricional, alcohólicas o inducidas por exposición a tóxicos o radiaciones, infecciosas o inflamatorias (Jensen et al., 2001, Baron, 2006).

Entre los síndromes de dolor neuropático de origen central podemos citar:

- Infarto cerebral: El 8% de los pacientes con infarto cerebral sufren dolor neuropático de origen central (Andersen et al., 1995).
- Lesión de la médula espinal: Puede ser de origen traumático, por compresión o infiltración tumoral, post isquémica o por exposición a radiaciones o agentes infecciosos como el VIH (Jensen et al., 2001, Baron, 2006).

- Dolor relacionado a síndromes de desaferentación: La interrupción total o parcial de la información aferente induce un desequilibrio en ciertos circuitos neuronales produciendo dolor. Un ejemplo de este tipo de cuadros clínicos es la esclerosis múltiple: los episodios reiterados de inflamación producen destrucción de la vaina de mielina, afectando la conducción de los impulsos eléctricos desde y hacia el cerebro (Kenner et al., 2007). El dolor es una manifestación sumamente frecuente en estos pacientes, alrededor el 28% de los mismos manifiesta dolor neuropático (Boivie, 1999, Kenner et al., 2007).
- Siringomielia: Se produce acumulación de líquido cefalorraquídeo dentro de una cavidad o quiste (siringe) como resultado de un defecto congénito o secundario a traumatismos, infecciones o tumores de la médula espinal (Hankinson et al., 2007). Con el tiempo el siringe se agranda y va comprimiendo la médula espinal (Hankinson et al., 2007). El 75% de los pacientes con siringomielia cursan con dolor devastante (Boivie, 1999). El único tratamiento posible es quirúrgico (Hankinson et al., 2007).

Características clínicas del dolor neuropático

La injuria nerviosa es causa de numerosas alteraciones sensitivas, con la paradójica yuxtaposición de dolor persistente y déficit sensitivo a estímulos nociceptivos (Treede et al., 1992, Jensen et al., 2001, Dworkin, 2002, Baron, 2006). En consecuencia, las alteraciones sensitivas presentadas por los pacientes con dolor neuropático se pueden clasificar en dos grandes grupos: fenómenos positivos (presencia de dolor o sensaciones

anormales) y fenómenos negativos (disminución de la sensibilidad) (Jensen et al., 2001, Dworkin, 2002, Baron, 2006).

En cuanto a los fenómenos positivos, el dolor puede desencadenarse en presencia o ausencia de estímulos (dolor provocado o espontáneo, respectivamente) (Dworkin, 2002, Baron, 2006). El dolor espontáneo puede ser continuo, constante y permanente, o ser paroxístico, episódico e intermitente (Jensen et al., 2001, Baron, 2006). El dolor provocado puede a su vez, responder a estímulos mecánicos (dinámicos o estáticos) o a estímulos térmicos (ya sea fríos o calientes), y las alteraciones en la respuesta pueden ser cualitativas (alodinia), cuantitativas (hiperalgesia) o témporo-espaciales (hiperpatía) (Jensen et al., 2001, Baron, 2006).

- Alodinia: Es una alteración cualitativa de la nocicepción, caracterizada por la presencia de respuestas dolorosas frente a estímulos que normalmente no causan dolor (Jensen et al., 2001, Baron, 2006). Aún estímulos sumamente leves como el contacto de la piel con la ropa o con una brisa suave pueden generar dolor (Baron, 2006). La alodinia es una de las alteraciones de la sensibilidad más frecuentemente detectadas en los pacientes con dolor neuropático (Jensen et al., 2001, Baron, 2006) y afecta significativamente la calidad de vida de los mismos. La alodinia es también característica de los modelos animales de dolor neuropático (Bennett and Xie, 1988, Chaplan et al., 1994, Choi et al., 1994). De hecho, se han diseñado procedimientos estandarizados a fin de poder evaluar la generación y la intensidad de la alodinia en animales (Chaplan et al., 1994, Choi et al., 1994). En particular, presentaremos en esta Tesis resultados experimentales obtenidos utilizando los Tests de von

Frey y Choi que evalúan la respuesta de los animales frente a la estimulación con filamentos que ejercen una cierta presión (estímulo mecánico estático) (Chaplan et al., 1994) o con una gota de acetona (estímulo térmico frío) (Choi et al., 1994), respectivamente.

- Hiperalgnesia: Aumento en la magnitud de la respuesta frente a un estímulo doloroso de baja intensidad (Treede et al., 1992, Dworkin, 2002, Baron, 2006).
- Hiperpatía: Es un síndrome doloroso caracterizado por una respuesta retrasada en el tiempo y explosiva, ante un estímulo doloroso (Baron, 2006). Se produce una disminución del umbral de respuesta a estímulos dolorosos (Dworkin, 2002).

Otros fenómenos positivos que se producen en estos pacientes como consecuencia de las alteraciones de la sensibilidad pero que no conducen necesariamente a la sensación de dolor son:

- Hiperestesia: Incremento en la sensibilidad ante un estímulo, excluyendo los sentidos especiales (no hay dolor) (Baron, 2006).
- Parestesia: Presencia de sensaciones anormales, no displacenteras, que pueden ser espontáneas o evocadas. Se trata de una perturbación de la sensibilidad caracterizada por la percepción de hormigueos, pinchazos, sensación de frío o calor, adormecimiento o vibraciones (Dworkin, 2002, Baron, 2006).

- Disestesia: Presencia de sensaciones anormales displacenteras, no necesariamente dolorosas, que pueden ser espontáneas o provocadas por un estímulo externo (Dworkin, 2002, Baron, 2006). Es una forma especial de parestesia.

Como se mencionó anteriormente, los cuadros de dolor neuropático también pueden cursar con una disminución de la sensibilidad frente a ciertos estímulos (Dworkin, 2002, Baron, 2006).

- Hipoestesia: Disminución de la sensibilidad ante la estimulación en el área afectada, excluyendo los sentidos especiales como visión, audición, olfato y gusto.
- Anestesia: Abolición de todas las formas de sensibilidad en el área afectada.
- Hipoalgesia: Disminución en la percepción del dolor en presencia de estímulos dolorosos. Es una forma especial de hipoestesia.
- Analgesia: Ausencia de dolor frente a estímulos dolorosos.

Según un estudio realizado en Francia, los términos más utilizados por los pacientes con dolor neuropático para describir las características del dolor que experimentan son: descarga eléctrica, quemazón, frío, picazón, hormigueo, comezón (Boureau et al., 1990).

Como consecuencia de estos trastornos del sensorio, los pacientes con dolor neuropático padecen limitaciones considerables en la realización de su

actividad habitual, presentan diferentes grados de discapacidad para realizar su trabajo y su comportamiento social se ve afectado (Gureje et al., 1998). En estas circunstancias, se habla con frecuencia de la llamada "triada de dolor", a saber: dolor, trastornos de la esfera emocional (ansiedad y depresión) y alteraciones del sueño (Gureje et al., 1998, McWilliams et al., 2003, Nicholson and Verma, 2004). Se estima que alrededor del 20% de los pacientes con neuralgia post herpética padece depresión, mientras que la presencia de ansiedad es notoria en sujetos con dolor neuropático de origen central o asociado a miembro fantasma (Haythornthwaite and Benrud-Larson, 2001). En la Figura 2 se muestra una pintura realizada por una paciente con dolor neuropático, en la que la autora refleja sus sentimientos de soledad, aislamiento, tristeza, depresión y pérdida de esperanza.

Los cuadros de dolor neuropático impactan fuertemente, no sólo sobre la salud y la calidad de vida del propio paciente, sino también sobre la de su familia. Por otra parte, el dolor neuropático se convierte en un problema de salud pública por el impacto que suponen el consumo y la utilización de recursos sanitarios (Jensen et al., 2001, Harden and Cohen, 2003), y por el agravio que ocasiona en la productividad laboral de los individuos afectados (horas de trabajo perdidas, menor productividad) (Berger et al., 2004).

Fisiología del dolor: vías de conducción y mediadores involucrados

El dolor es una experiencia perceptual compleja que resulta de integrar la información sensitiva acerca de la localización, el tipo y la intensidad de un estímulo, con aspectos afectivos, emocionales y cognitivos. La experiencia de dolor es el producto final de una intrincada red de procesamiento de información. El hecho de que un estímulo

particular sea percibido como doloroso depende no sólo de la naturaleza del estímulo, sino también del contexto en el cual es experimentado, la presencia de determinados recuerdos, emociones, etc. Es decir, que la experiencia de dolor es un fenómeno complejo que resulta de la interacción de factores biológicos, psicológicos y sociales. En la presente Tesis nos centraremos en los factores de índole biológica involucrados en la neurotransmisión del dolor.

Las neuronas encargadas de detectar estímulos sensitivos de tipo mecánico, térmico o químico se denominan neuronas aferentes primarias y se encuentran alojadas en los ganglios raquídeos, o ganglios anexos a la raíz dorsal (GARDs), ubicados a ambos lados de la médula espinal (Hendry et al., 1999, Millan, 1999) (Fig. 3). Son neuronas pseudounipolares, es decir, emiten un único proceso axonal corto que se divide dando origen a dos proyecciones: una constituye los nervios periféricos inervando la piel, los músculos, las articulaciones y las vísceras, y la otra, denominada proyección central, ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales, haciendo sinapsis con neuronas locales y de proyección localizadas en las láminas superficiales y profundas del asta dorsal (Hendry et al., 1999, Millan, 1999) (Fig. 3). El nervio ciático, nervio que se utiliza como sitio de lesión en los modelos animales de dolor neuropático que se evalúan en la presente Tesis, está constituido en su porción sensitiva, por las proyecciones periféricas de las neuronas aferentes primarias alojadas en los ganglios lumbares 3, 4, 5 y 6 en la rata, y en los ganglios lumbares 4 y 5 y sacros 1, 2 y 3 en el hombre (Latarjet and Ruiz Liard, 1995).

Las neuronas aferentes primarias se diferencian por el tamaño de su cuerpo celular, el diámetro de sus axones, las moléculas que expresan, el tipo de información que

conducen y la velocidad con que lo hacen (Willis and Coggeshall, 1991, Lawson, 1992, Lawson, 1996, Millan, 1999, Julius and Basbaum, 2001, Lawson, 2002) (ver Fig. 4). En base al tamaño del cuerpo celular, se las ha clasificado neuronas pequeñas, medianas y grandes (Lawson, 1992, Millan, 1999). Las neuronas de pequeño tamaño dan origen a fibras finas, amielínicas, también llamadas fibras C, las neuronas medianas originan fibras mielínicas delgadas o $A\delta$, y las neuronas de gran tamaño dan origen a fibras mielínicas gruesas o $A\beta$ (Lawson, 1992, Hendry et al., 1999) (Figs. 3 y 4). La presencia de la vaina de mielina favorece la conducción del impulso nervioso, de modo que las fibras $A\beta$ son de rápida conducción, las $A\delta$ tienen velocidad intermedia, y en las fibras C el impulso es conducido lentamente (Millan, 1999) (Fig. 4).

En relación al tipo de información procesada, las neuronas de gran tamaño normalmente detectan estímulos no nociceptivos de baja intensidad (de tipo táctil, vibratorio y de presión), por lo que también se denominan neuronas de bajo umbral (Lawson, 1992, Hendry et al., 1999, Millan, 1999). Sin embargo luego de una injuria neural, adquieren la capacidad de transmitir información dolorosa frente a la estimulación mecánica (Mense, 1986, Willis and Coggeshall, 1991).

Por su parte, las neuronas pequeñas y medianas, neuronas de alto umbral, responden a estímulos nocivos de alta intensidad (Hendry et al., 1999, Millan, 1999, Lawson, 2002) (Fig. 4). Estas neuronas dan origen a terminales nerviosos libres, no encapsulados, en la mayoría de los tejidos incluyendo la piel, los músculos, las articulaciones y las vísceras, y se encargan de conducir la información dolorosa (Hendry et

al., 1999, Millan, 1999). Los estímulos nociceptivos son detectados por receptores específicos, los nociceptores, localizados en dichos terminales nerviosos periféricos (Millan, 1999). Las neuronas pequeñas productoras de fibras C expresan termo y mecanoreceptores que detectan estímulos térmicos y mecánicos dolorosos (Millan, 1999). Ciertas fibras C presentan nociceptores polimodales que además de responder a estímulos térmicos y mecánicos, son sensibles a químicos irritantes (Millan, 1999, Julius and Basbaum, 2001). Finalmente, las fibras C también presentan nociceptores “silenciosos” o “durmientes” que en condiciones normales no responden a estímulos nocivos, sino que son activados por varios mediadores químicos en condiciones de injuria neural o inflamación (Millan, 1999). Por su parte, las neuronas medianas productoras de fibras A δ se clasifican en dos tipos, I y II (Millan, 1999). Ambos tipos de fibras A δ detectan y conducen información sobre estímulos mecánicos dolorosos, pero mientras que las fibras A δ de tipo I son sensibles a estímulos térmicos no nociceptivos, las de tipo II conducen información térmica nociceptiva (Treede et al., 1990, Millan, 1999).

Los diferentes tipos de estímulos activan nociceptores específicos e inducen la despolarización de los terminales sensitivos mediante un mecanismo complejo (Hendry et al., 1999, Millan, 1999). Los terminales nerviosos periféricos de las neuronas aferentes primarias contienen receptores para un amplio número de mediadores químicos como prostanoïdes, bradiquinina, serotonina, histamina, protones y trifosfato de adenosina (ATP) (Millan, 1999). Los nociceptores son fundamentalmente promiscuos, de forma tal que el ATP actúa sobre la gran familia de los receptores purinérgicos, los protones actúan a través de canales iónicos sensibles a ácidos, y ambos mediadores pueden activar también

receptores de potencial transiente (TRP, *Transient Receptor Potencial*). Los integrantes de la familia TRP, canales catiónicos sensibles a la temperatura, median la sensibilidad a estímulos térmicos tanto inocuos como nocivos (McKemy et al., 2002, Tominaga and Caterina, 2004, Facer et al., 2007).

Los diferentes tipos de estímulos nocivos actúan sobre los nociceptores presentes en los tejidos, y estos convierten las señales dolorosas en impulsos eléctricos que viajan a lo largo del nervio periférico hasta los GARDs. Desde allí, la información es transmitida hacia la médula espinal: las proyecciones centrales de las neuronas aferentes primarias penetran, a través de las raíces dorsales, en el asta dorsal y hacen sinapsis con interneuronas locales y neuronas de proyección (Hendry et al., 1999, Millan, 1999).

Recordemos que en la médula espinal se reconocen dos áreas bien definidas: la sustancia gris y la sustancia blanca (Latarjet and Ruiz Liard, 1995). La sustancia gris, de localización central, se divide en astas dorsal, ventral y lateral (esta última sólo a nivel torácico) y se compone de cuerpos neuronales, fibras dendríticas y axonales y células gliales (Latarjet and Ruiz Liard, 1995). Por su parte, la sustancia blanca, de localización periférica, está conformada por las proyecciones de neuronas locales de la sustancia gris medular, aferencias de los GARDs y de distintos sectores del sistema nervioso central, organizadas en haces nerviosos ascendentes y descendentes (Latarjet and Ruiz Liard, 1995). La sustancia gris medular ha sido dividida en diez láminas, teniendo en cuenta la citoarquitectura de las diferentes poblaciones neuronales: las primeras cinco corresponden al asta dorsal, las láminas VI y VII a la zona intermedia, las láminas VIII y IX al asta ventral, y la lámina X a la zona periependimaria (Rexed, 1952). Las láminas

I y II se denominan también zona marginal y sustancia gelatinosa, respectivamente (Latarjet and Ruiz Liard, 1995).

Antes de entrar a la médula, las fibras A δ y C se dividen en ramas ascendentes y descendentes que se distribuyen en el tracto de Lissauer (sustancia blanca dorsolateral), ocupando de uno a seis segmentos medulares y terminando, la mayoría, en las láminas I y II, y algunas pocas en las láminas III-V (Burgess and Perl, 1967, Zimmerman, 1976, Light and Perl, 1979). Las fibras A β se dividen en dos grupos: el primero asciende por los cordones posteriores para alcanzar los núcleos *gracilis* y *cuneatus* del bulbo raquídeo, donde activan las neuronas del sistema lemniscal, responsable de las sensaciones táctiles y propioceptivas (Willis and Coggeshall, 1991). Algunas de estas fibras emiten colaterales hacia las láminas II-IV antes de iniciar el ascenso (Bennett et al., 1983, Hendry et al., 1999). El segundo grupo de fibras A β penetra en varios segmentos de la sustancia gris medular, terminando fundamentalmente a nivel de las láminas III-V (Ralston and Ralston, 1982, Hendry et al., 1999).

Las neuronas específicamente nociceptivas de la médula espinal se encuentran ubicadas principalmente en las láminas I y II, y reciben los estímulos dolorosos de gran intensidad conducidos por las fibras C y A δ (Dubner et al., 1989, Willis and Coggeshall, 1991, Cervero, 1995). En la lámina V se localizan las denominadas neuronas de rango dinámico amplio (Millan, 1999). Estas neuronas reciben información sobre estímulos mecánicos, térmicos y químicos, tanto inocuos como nocivos, conducidos por fibras A β , A δ y C, siendo capaces de percibir la intensidad del estímulo (Mense, 1986, Dubner et al.,

1989, Ness and Gebhart, 1990). Por otra parte, en las láminas II-IV del asta dorsal se localizan neuronas no nociceptivas (Millan, 1999, Basbaum and Bushnell, 2002). Las tres clases de neuronas mencionadas son neuronas de proyección y conducen la información hacia centros superiores. Existen también en las lámina I-IV de la médula espinal, interneuronas locales que modulan la recepción y la retransmisión de la información sobre estímulos sensoriales (Basbaum and Bushnell, 2002).

Las proyecciones centrales de las neuronas aferentes primarias liberan en el asta dorsal neurotransmisores excitatorios y péptidos (Willis and Coggeshall, 1991, Millan, 1999). El principal neurotransmisor excitatorio liberado por las neuronas aferentes primarias es el glutamato (Willis and Coggeshall, 1991, Millan, 1999, Bleakman et al., 2006). El glutamato posee receptores ionotrópicos (asociados directamente a canales iónicos) y metabotrópicos (asociados a segundos mensajeros intracelulares). Los tres tipos de receptores ionotrópicos, NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y kainato se encuentran presentes en las neuronas del asta dorsal de la médula (Millan, 1999, Bleakman et al., 2006). Mientras que los receptores AMPA se encuentran activos durante las respuestas a estímulos tanto inocuos como nocivos, los receptores del tipo NMDA no participan en la respuesta a estímulos no nociceptivos (Millan, 1999) (Fig. 4). Sólo estímulos nociceptivos intensos, repetitivos o sostenidos conducen a la apertura de este canal iónico, induciendo la despolarización neuronal (Millan, 1999). De este modo, los receptores NMDA participan en los procesos de dolor crónico, ya sea inflamatorio o neuropático, en los que juegan un papel crítico, tanto en la inducción como en el mantenimiento del dolor (Bleakman et al., 2006).

Además de neurotransmisores excitatorios (glutamato, aspartato), las proyecciones centrales de las neuronas aferentes primarias liberan péptidos (Willis and Coggeshall, 1991, Millan, 1999), entre los cuales la sustancia P ha sido el más estudiado. Este péptido de 11 aminoácidos pertenece al grupo de las neuroquininas y actúa preferentemente sobre receptores para neuroquinina tipo 1 (NK₁) (Millan, 1999). La sustancia P es un neuromediador excitatorio que modula la transmisión sináptica nociceptiva dependiente de los receptores NMDA (Urban et al., 1994). El péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP, *Calcitonin Gene Related Peptide*) es un péptido de 37 aminoácidos que pertenece a la familia de la calcitonina y que al ser liberado por las fibras aferentes primarias en respuesta a una estimulación nociceptiva, es capaz de potenciar los efectos excitatorios de la sustancia P (Levine et al., 1993). Muchos otros péptidos se encuentran expresados en las neuronas aferentes primarias y son liberados en el asta dorsal de la médula espinal en respuesta a una estimulación nociceptiva (Millan, 1999). Entre ellos podemos nombrar a la somatostatina, la colecistoquinina, el péptido intestinal vasoactivo, la galanina y el neuropéptido Y (NPY) (Millan, 1999). Los resultados presentados en la presente Tesis se centran en los neuropéptidos NPY y galanina, por lo que serán presentados con mayor detalle en apartados posteriores. Como se verá más adelante, otros neurotransmisores como la serotonina, las catecolaminas y los péptidos opioides endógenos intervienen en la modulación de la señal nociceptiva a nivel de la médula espinal (Millan, 1999, Millan, 2002).

Desde la médula, el estímulo es transmitido a través de vías ascendentes a diferentes regiones del sistema nervioso central, principalmente al tálamo, a través de los haces espinotalámico, espinoreticular y cervicotalámico; al mesencéfalo, sustancia

gris periacueductal y núcleos parabraquiales a través del haz espinomesencefálico; y al hipotálamo, a través del haz espinohipotálamico (Latarjet and Ruiz Liard, 1995). La estimulación de los núcleos parabraquiales se proyecta al núcleo amigdalino implicado en el control de las emociones, sustentando el componente afectivo del dolor (Millan, 1999).

Desde el tálamo, la información acerca de la calidad, la intensidad y la localización del dolor es transmitida a la corteza cerebral, donde se produce el procesamiento definitivo de la información dolorosa (Millan, 1999). El sistema nervioso central utiliza vías descendentes inhibitorias que transcurren por el fascículo dorsolateral de la médula espinal (vía de Lissauer) para modular la transmisión de los estímulos nociceptivos (Millan, 1999, Millan, 2002). En particular, la sustancia gris periacueductal inhibe neuronas nociceptivas de la médula espinal, principalmente a través de conexiones excitatorias con neuronas serotoninérgicas del núcleo magno del rafe (Millan, 1999, Millan, 2002). Desde el *locus coeruleus* noradrenérgico y diferentes núcleos del bulbo y la protuberancia, parten sistemas inhibidores descendentes que modulan la actividad de las neuronas nociceptivas del asta dorsal de la médula (Millan, 1999, Millan, 2002). En ausencia de estimulación dolorosa, las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas de las vías descendentes inhibitorias se encuentran inhibidas por neuronas que contienen ácido γ -amino butírico (GABA) y que se encuentran presentes en la sustancia gris periacueductal (Millan, 1999, Millan, 2002). Al producirse un estímulo doloroso, las fibras que constituyen en haz espinomesencefálico liberan endorfinas a nivel de la sustancia gris periacueductal, produciendo la inhibición de las neuronas gabaérgicas (Millan, 1999, Millan, 2002). El resultado de esta doble inhibición es la facilitación de las vías descendentes. La serotonina y la noradrenalina

liberadas en el asta dorsal actúan sobre los terminales aferentes primarios inhibiendo la liberación de neurotransmisores como el glutamato y la sustancia P, mientras que favorecen la liberación de encefalinas por parte de interneuronas locales (Millan, 2002). Como consecuencia disminuye la transmisión de impulsos dolorosos hacia el tálamo, y desde este, a la corteza sensitiva (Millan, 1999, Millan, 2002).

Fisiopatología y mecanismos moleculares del dolor neuropático

La injuria del sistema nervioso induce cambios en la transmisión normal del impulso doloroso, generando dolor neuropático (Millan, 1999, Baron, 2006, Campbell and Meyer, 2006, Truini and Cruccu, 2006). Diversas alteraciones han sido descritas en las terminaciones nerviosas periféricas, en los GARDs, en el asta posterior de la médula espinal y en la corteza somatosensorial (Millan, 1999, Basbaum and Bushnell, 2002, Campbell and Meyer, 2006, Truini and Cruccu, 2006). Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la generación y el mantenimiento del dolor neuropático distan de estar esclarecidos. La bibliografía sobre el tema, ya sea basada en modelos animales o en estudios clínicos, ofrece múltiples posibles mecanismos que en forma independiente o combinada pueden dar origen a los cuadros de dolor crónico (Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Campbell and Meyer, 2006, Truini and Cruccu, 2006). De ninguna manera pretendemos abarcar en esta Tesis el amplio espectro de factores y mecanismos fisiopatológicos involucrados en la generación del dolor neuropático. Simplemente haremos una breve mención de aquellos aspectos que consideramos oportunos para la mejor comprensión de los resultados experimentales presentados.

Algunos de los mecanismos propuestos, y actualmente en estudio, se citan a continuación:

- Sensibilización periférica y actividad ectópica de fibras C/A δ
- Activación de nociceptores silenciosos
- Activación cruzada entre neuronas nociceptivas y no nociceptivas
- Cambios fenotípicos de las neuronas aferentes primarias
- Activación simpática de las neuronas sensitivas dañadas
- Reorientación de las terminaciones periféricas y centrales de las neuronas aferentes primarias
- Sensibilización y aumento de la excitabilidad de neuronas del asta dorsal
- Activación tónica de los circuitos descendentes facilitadores
- Inhibición de las vías descendentes antinociceptivas

Mecanismos periféricos

Estudios electrofisiológicos de fibras amielínicas C de nervios lesionados muestran un aumento de la actividad espontánea, hiperexcitabilidad y aumento de la sensibilidad a estímulos mecánicos, térmicos y químicos (Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Truini and Cruccu, 2006). El fenómeno de sensibilización periférica se debe a un desbalance en la expresión de receptores y canales iónicos en las neuronas aferentes primarias (Zimmermann, 2001, Jensen and Baron, 2003, Truini and Cruccu, 2006). La injuria neural induce cambios en la expresión de receptores en los terminales nerviosos

periféricos, modificando la sensibilidad de las fibras nerviosas frente a sustancias endógenas como prostaglandinas, histamina, bradiquinina, neurotransmisores simpáticos, ATP o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Truini and Cruccu, 2006). La lesión del nervio también genera un aumento en la transcripción y el transporte axonal de canales de sodio al sitio de la injuria (Devor et al., 1993, Devor, 2006), y una concomitante disminución en el número de canales de potasio, generando un estado de hiperexcitabilidad neuronal (Basbaum and Bushnell, 2002). Como consecuencia de la injuria, se produce también un aumento en la expresión de canales de calcio voltaje-dependientes (Matthews and Dickenson, 2001). El estado de hiperexcitabilidad neuronal y la entrada de calcio a los aferentes primarios favorecen la liberación de glutamato y sustancia P a nivel del asta dorsal de la médula espinal, contribuyendo a la activación de las vías nociceptivas (Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Truini and Cruccu, 2006).

Sumado al desbalance en la expresión de receptores y canales iónicos, la alteración del transporte axonal rápido, sistema que permite el traslado de las proteínas recientemente sintetizadas hasta su sitio de acción, trae como consecuencia la ubicación anómala de las mismas (Truini and Cruccu, 2006). Este fenómeno contribuye al aumento de la excitabilidad neuronal, con desarrollo de actividad ectópica, y la consecuente generación de dolor espontáneo (Zimmermann, 2001, Jensen and Baron, 2003, Truini and Cruccu, 2006). Las descargas repetitivas de las fibras dañadas producen activación cruzada, no sináptica, de las fibras sanas adyacentes resultando en una amplificación del impulso doloroso (Millan, 1999).

Por otra parte, en el caso particular en que un nervio es seccionado, se forma un neuroma, donde las fibras en proceso de regeneración emiten proyecciones que, al carecer de la orientación que normalmente le brindan las células de Schwann, forman una especie de ovillo (Millan, 1999, Truini and Cruccu, 2006). También a nivel del neuroma se generan descargas anómalas que se traducen en actividad espontánea de las fibras afectadas (Blumberg and Janig, 1984, Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006).

Se ha demostrado que la actividad espontánea y las alteraciones en la sensibilidad afectan no sólo a las fibras lesionadas sino también a aquellas que permanecieron intactas luego de la injuria periférica (Ali et al., 1999, Wu et al., 2001, Baron, 2006, Djouhri et al., 2006). Así por ejemplo, fibras sanas desarrollan sensibilidad adrenérgica (Sato and Perl, 1991, Ali et al., 1999) y aumentan la sensibilidad al TNF α (Schafers et al., 2003a, Schafers et al., 2003b), luego de la lesión neural.

Todos estos fenómenos se deben a cambios en la expresión de genes. En condiciones normales, los terminales nerviosos sensitivos incorporan sustancias, como por ejemplo factores tróficos, que luego, por transporte axonal retrógrado, son transportados hasta los cuerpos neuronales, donde modifican la transcripción de genes y la síntesis de proteínas (Millan, 1999). Al producirse una lesión del nervio, este transporte se ve impedido, y por lo tanto se desregula la expresión de proteínas, resultando en cambios fenotípicos de las neuronas aferentes primarias.

Los factores tróficos producidos a nivel del tejido innervado tienen gran influencia

sobre las fibras sensitivas y motoras (Millan, 1999). Al lesionarse el nervio, cambian los niveles de expresión de dichos factores tróficos, no sólo en el tejido privado de inervación, sino también en las células de Schwann afectadas por la degeneración Walleriana, en los GARDs y en el asta dorsal (McMahon and Priestley, 1995, Boucher and McMahon, 2001). Se ha propuesto un mecanismo dual mediante el cual los factores tróficos afectan tanto a las fibras lesionadas como a las intactas. Mientras que los axones afectados por la lesión pierden la influencia de los factores tróficos al perder conectividad con el tejido inervado, las fibras sanas se constituyen en blanco del incremento en la expresión de dichos factores por parte del tejido denervado (McMahon and Priestley, 1995, Boucher and McMahon, 2001).

Mecanismos centrales

Como se mencionó en párrafos anteriores, la hiperexcitabilidad de las fibras dañadas conduce a un aumento en la liberación de neurotransmisores en el asta dorsal de la médula espinal, produciendo una estimulación dolorosa sostenida (Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Truini and Cruccu, 2006). Los terminales centrales de las neuronas aferentes primarias liberan glutamato, sustancia P y neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *Brain Derived Neurotrophic Factor*), que actúan sobre los receptores NMDA, NK₁ y Trk_B, respectivamente, localizados en la membrana postsináptica (Millan, 1999, Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Truini and Cruccu, 2006). Como consecuencia se activan varias cascadas de señalización intracelular en las neuronas espinales que derivan en la modulación del proceso de transcripción génica. Así por ejemplo, aumenta la expresión de canales de sodio en

las neuronas que constituyen el haz espinotalámico (Willis, 2002, Ji et al., 2003), principal vía ascendente nociceptiva. De esta forma, aumenta la sensibilidad de las neuronas espinales, se reduce su umbral de activación y crece la respuesta a los impulsos aferentes, dando origen al fenómeno de sensibilización central (Willis, 2002, Ji et al., 2003). En estas condiciones, los mecanorreceptores de bajo umbral correspondientes a las fibras A β , son capaces de activar a las neuronas del haz espinotalámico, ganando acceso a las vías de conducción nociceptivas y generando las ya descritas respuestas alodínicas.

Este proceso de sensibilización central, está fundamentalmente mediado por el glutamato y su receptor NMDA (Millan, 1999, Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Truini and Cruccu, 2006). Al activar los receptores NMDA ubicados en la membrana postsináptica del asta dorsal, el glutamato produce una importante despolarización (influjo de calcio y sodio y eflujo de potasio), fenómeno conocido como potenciación sináptica (Basbaum and Bushnell, 2002, Baron, 2006, Truini and Cruccu, 2006).

La liberación de glutamato es inhibida a nivel presináptico por varios receptores metabotrópicos asociados a proteína G, como el receptor opioide de tipo μ , el receptor GABA-B y los receptores purinérgicos (Millan, 1999). Se ha descrito una disminución en la expresión del receptor opioide μ en el asta dorsal luego de la injuria nerviosa, tanto a nivel pre como postsináptico (Kohno et al., 2005), que estaría favoreciendo la liberación de glutamato. Por otra parte, el aumento en la expresión de canales de calcio voltaje-dependientes descrito en los terminales aferentes primarios luego de la injuria (Li et al., 2004), contribuiría al incremento en la liberación de neurotransmisores.

La lesión del nervio periférico produce asimismo, hipertrofia y activación de células gliales, incluyendo la microglía de la sustancia gris de la médula espinal (Millan, 1999). Las células de la microglía expresan el receptor purinérgico P_2X_4 , por lo que son activadas por ATP. Luego de su activación, liberan citoquinas pronociceptivas, como la interleuquina-1 (IL-1), el $TNF\alpha$, y neurotrofinas como el BDNF, que exacerban la transmisión nociceptiva y contribuyen al mantenimiento del dolor neuropático (Millan, 1999).

Por otra parte, también la pérdida de señales aferentes induce cambios importantes en la excitabilidad neuronal a nivel del asta dorsal (Millan, 1999). Así por ejemplo, la disminución en el input de fibras $A\beta$ determina una disminución en la actividad de las interneuronas locales encargadas de inhibir a las neuronas nociceptivas (pérdida de la inhibición aferente) (Millan, 1999). Asimismo, la hipoactividad de las vías antinociceptivas descendentes, también contribuye al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (Zimmermann, 2001).

De esta forma, las neuronas del sistema nervioso periférico y central continúan transmitiendo señales dolorosas una vez pasado el daño original, activando una continua y permanente respuesta a nivel central.

Neuropéptidos y neuromoduladores

Shehab y Atkinson fueron los primeros en demostrar que la injuria nerviosa periférica induce importantes cambios en la expresión de neuropéptidos en las neuronas aferentes primarias (Shehab and Atkinson, 1986). Estos autores describieron un aumento en los niveles de péptido intestinal vasoactivo en la médula espinal de animales con axotomía de su nervio ciático. En los años siguientes, se demostró que la lesión del nervio periférico induce cambios en la expresión de muchos otros péptidos (Hökfelt et al., 1994, Dickinson and Fleetwood-Walker, 1999, Wiesenfeld-Hallin and Xu, 2001, Przewlocki and Przewlocka, 2005, Brumovsky et al., 2007), y actualmente, con la aplicación de los estudios de *microarrays*, este conocimiento se ha expandido a cientos de genes cuya expresión es estimulada o inhibida en las neuronas aferentes primarias, luego de diferentes tipos de lesión (Costigan et al., 2002, Wang et al., 2002a, Xiao et al., 2002, Zhang and Xiao, 2005, Rodriguez Parkitna et al., 2006).

En secciones anteriores hemos realizado una breve mención de la sustancia P, el CGRP y los péptidos opioides. A continuación nos referiremos con mayor detalle al neuropéptido Y y la galanina, foco de estudio de la presente Tesis. También introduciremos al óxido nítrico (NO), neuromodulador gaseoso que participa en la neurotransmisión nociceptiva.

Neuropéptido Y

El neuropéptido Y, también conocido como neuropéptido tirosina o NPY, es un péptido de 36 aminoácidos descrito por primera vez por Tatemoto y cols. en 1982 (Tatemoto et al., 1982). Se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso periférico y central (Allen et al., 1983, Chronwall et al., 1985, de Quidt and Emson, 1986a, de Quidt and Emson, 1986b), y su estructura se ha mantenido altamente conservada a lo largo de la evolución (Larhammar and Salaneck, 2004).

En condiciones normales, los niveles de NPY son casi indetectables en las neuronas aferentes primarias, tanto por técnicas de inmunohistoquímica como de hibridación *in situ* (Gibson et al., 1984, Wakisaka et al., 1991, Wakisaka et al., 1992, Zhang et al., 1993a, Nahin et al., 1994, Brumovsky et al., 2004). Por el contrario, en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal existen normalmente abundantes fibras NPY-inmunoreactivas (IR) (Gibson et al., 1984). Las mismas tienen su origen principalmente en neuronas locales (Gibson et al., 1984) que coexpresan GABA (Rowan et al., 1993), y por lo tanto constituyen, presumiblemente, interneuronas inhibitorias. También contribuyen a esta red superficial, un pequeño número de terminales aferentes primarios, así como vías descendentes, como por ejemplo neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* que coexpresan NPY (Holets et al., 1988).

El NPY se une a, al menos, 5 subtipos de receptores: Y₁-Y₅; sin embargo sólo el Y₁ y el Y₂ se han detectado mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en las neuronas aferentes primarias (Mantyh et al., 1994, Zhang et al., 1994a, Zhang et al.,

1994b, Zhang et al., 1997, Brumovsky et al., 2002). Existen algunas diferencias en cuanto a la distribución y la localización de estos receptores en las distintas especies (Zhang et al., 1994a, Zhang et al., 1994b, Zhang et al., 1997, Shi et al., 1998b, Zhang et al., 1999, Landry et al., 2000, Brumovsky et al., 2005). En la rata, el receptor Y_1 se expresa en alrededor del 20% de las neuronas aferentes primarias, fundamentalmente de pequeño tamaño (Mantyh et al., 1994, Zhang et al., 1994a, Zhang et al., 1994b, Zhang et al., 1999), mientras que el receptor Y_2 se ha detectado en un 15% de las neuronas presentes en los GARDs, en este caso, medianas y grandes (Mantyh et al., 1994, Zhang et al., 1997). En cuanto a la localización subcelular, ambos receptores se encuentran generalmente asociados a la membrana plasmática (Zhang et al., 1994a, Zhang et al., 1999, Brumovsky et al., 2005), sugiriendo que el NPY puede activar receptores somáticos. El receptor Y_1 colocaliza con el neuropéptido CGRP, formando parte de la subpoblación neuronal peptidérgica (Zhang et al., 1994a). Por el contrario, las neuronas en las que se detecta el Y_2 raramente coexpresan este marcador (Brumovsky et al., 2005).

En la médula espinal, el receptor Y_1 se encuentra ampliamente distribuido y se han descrito al menos 7 poblaciones neuronales Y_1 -IR (Brumovsky et al., 2006a, Brumovsky et al., 2007, Hökfelt et al., 2007). Estas poblaciones neuronales se diferencian en base a su morfología y a su localización y se han clasificado en diferentes grupos: tipo 1, son neuronas pequeñas, sumamente abundantes y presentes en las láminas I y II; tipo 2, incluye un escaso número de neuronas de gran tamaño localizadas en lámina I; tipo 3, son neuronas pequeñas presentes en la lámina III, morfológicamente similares a las neuronas de tipo 1, pero se encuentran en menor número; tipo 4, incluye neuronas grandes, multipolares, localizadas en el área límite entre las láminas III y IV y que proyectan

sus dendritas hacia las láminas I y II; tipo 5, son neuronas grandes, multipolares de las láminas V y VI, con largos procesos craniocaudales; tipo 6, incluye grandes neuronas multipolares ubicadas alrededor del canal central (área X); y tipo 7, neuronas de gran tamaño localizadas en la zona medial de las astas ventrales (lámina VIII) (Brumovsky et al., 2006a, Brumovsky et al., 2007, Hökfelt et al., 2007). En cuanto al receptor Y₂, su presencia en la médula espinal se ha detectado únicamente en los terminales nerviosos de las neuronas aferentes primarias, fundamentalmente a nivel de las láminas I y II, con ausencia de neuronas locales Y₂-IR (Brumovsky et al., 2005, Brumovsky et al., 2007, Hökfelt et al., 2007).

Estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* muestran un importante incremento en los niveles de expresión del NPY en las neuronas aferentes primarias luego de una injuria mecánica del nervio periférico (Wakisaka et al., 1992, Nahin et al., 1994, Shi et al., 1999, Landry et al., 2000, Brumovsky et al., 2004, Hökfelt et al., 2007). Este incremento se produce fundamentalmente en neuronas medianas y grandes (Wakisaka et al., 1991, Wakisaka et al., 1992, Nahin et al., 1994, Shi et al., 1999, Landry et al., 2000, Brumovsky et al., 2004, Hökfelt et al., 2007), y se acompaña de un aumento en la inmunoreactividad para el neuropéptido en las láminas I-IV del asta dorsal de la médula espinal (Wakisaka et al., 1991, Wakisaka et al., 1992, Shi et al., 1999, Brumovsky et al., 2004, Hökfelt et al., 2007). La expresión del receptor Y₁ en los GARDs disminuye luego de la injuria (Landry et al., 2000, Brumovsky et al., 2004, Hökfelt et al., 2007), mientras que la del receptor Y₂ se ve incrementada (Landry et al., 2000, Hökfelt et al., 2007). Por el contrario, en la médula espinal no se observan cambios en la expresión de ambos receptores luego de la injuria (Brumovsky et al., 2004, Hökfelt et al., 2007).

Se ha propuesto que la desregulación de la expresión del NPY, así como la de otros neuropéptidos luego de una injuria periférica se debe a una privación de factores tróficos que son normalmente producidos en los tejidos inervados y transportados a lo largo de los axones hacia el soma neuronal por el sistema de transporte axonal retrógrado (McMahon and Priestley, 1995, Verge et al., 1995). En particular, se ha visto que el incremento en la expresión del NPY desencadenado por una axotomía del nervio ciático es parcialmente revertido luego de la administración del factor de crecimiento neural (NGF, *Nerve Growth Factor*) (Verge et al., 1995). El transporte axonal retrógrado puede ser bloqueado experimentalmente utilizando agentes despolimerizantes de microtúbulos como la colchicina (Weisenberg et al., 1968, Strott and Ray, 1977, Ginn and Peterson, 1992). En el contexto clínico, se ha propuesto que la neuropatía inducida por drogas antineoplásicas como la vincristina y el paclitaxel se debe, entre otros mecanismos, a su acción como agentes bloqueantes del transporte axonal (Topp et al., 2000). En la sección “Resultados – Proyecto 1” de esta Tesis se presentan los datos obtenidos al evaluar la inmunoreactividad del NPY y su receptor Y_1 en los GARDs de animales con inyección intraneural de colchicina.

En cuanto a los mecanismos de señalización intracelular, los receptores Y_1 e Y_2 se encuentran asociados a proteínas G del tipo G_i/G_0 , por lo que su activación induce: la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC), con disminución de las concentraciones intracelulares de la forma cíclica del nucleótido adenosina monofosfato (AMPc) y la consiguiente inactivación de la proteína quinasa A (PK_A) (Grouzmann et al., 2001, Sun et al., 2001, Silva et al., 2002, Wang, 2005, Eva et al., 2006); la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Nie and Selbie, 1998); y la activación de la

enzima fosfolipasa C (PL_C), con el consiguiente aumento de la concentración intracelular de inositol trifosfato (IP₃) y calcio, y activación de la proteína quinasa C (PK_C) (Grouzmann et al., 2001, Heredia et al., 2005). Ambos receptores también se han asociado a la activación de canales de potasio acoplados a proteínas G (Sun et al., 2001, Silva et al., 2002) y a la modulación de canales de calcio (Nie and Selbie, 1998, Grouzmann et al., 2001, Sun et al., 2001, Silva et al., 2002, Heredia et al., 2005, Wang, 2005, Eva et al., 2006). También se ha propuesto la participación del receptor Y₁ en la modulación de la vía de señalización del NO (Silva et al., 2002). En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de las diferentes vías de señalización intracelular asociadas a los receptores Y₁ e Y₂.

Se le han atribuido al NPY tanto efectos pro (Tracey et al., 1995, White, 1997, Xu et al., 1999, Ossipov et al., 2002, Lin et al., 2004, Gibbs et al., 2007, Son et al., 2007) como antinociceptivos (Hua et al., 1991, Xu et al., 1999, Naveilhan et al., 2001, Taiwo and Taylor, 2002, Gibbs et al., 2004, Gibbs et al., 2007). Por lo general, los efectos inhibitorios del NPY se asocian a la activación del receptor Y₁, mientras que los efectos excitatorios son mediados por el receptor Y₂ (Brumovsky et al., 2007, Gibbs et al., 2007). Sin embargo, se ha demostrado que el receptor Y₂ también puede ejercer efectos inhibitorios, reduciendo la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Colmers and Bleakman, 1994, Smith et al., 2007). Por otra parte, la presencia del receptor Y₁ en 7 poblaciones neuronales diferentes de la médula espinal genera múltiples blancos de acción para el NPY liberado por los terminales aferentes primarios (Brumovsky et al., 2006a, Brumovsky et al., 2007, Hökfelt et al., 2007). Así por ejemplo, la activación de interneuronas locales Y₁-IR y presumiblemente glutamatérgicas presentes en las láminas superficiales del

asta dorsal, probablemente se relacione con los efectos antinociceptivos del NPY (Brumovsky et al., 2006a, Brumovsky et al., 2007, Hökfelt et al., 2007). Por otra parte, hasta hace poco tiempo, se consideraba que el receptor Y_1 se encontraba ubicado en la post sinapsis, mientras que el receptor Y_2 era de localización presináptica y, en consecuencia, modulaba la liberación de neurotransmisores (Wahlestedt et al., 1986). Sin embargo, datos recientes sugieren que esta regla no siempre se cumple y que ambos receptores pueden localizarse tanto a nivel pre como postsináptico (Pickel et al., 1988, St-Pierre et al., 2000). Por consiguiente, existe una gran variedad de posibles formas de modular la neurotransmisión nociceptiva a través de poblaciones neuronales que expresan diferentes o varios subtipos de receptores del NPY. La existencia de un complejo circuito que involucra al neuropéptido y a sus receptores a nivel de los ganglios raquídeos y de la médula espinal (Abdulla and Smith, 1999, Brumovsky et al., 2002, Moran et al., 2004, Brumovsky et al., 2005, Miyakawa et al., 2005, Brumovsky et al., 2006a, Shi et al., 2006b) contribuye a la complejidad de este sistema.

Galanina

La galanina es un neuropéptido de 29 aminoácidos (30 en humanos), descrito por primera vez por Tatemoto y cols. en 1983 (Tatemoto et al., 1983). Tiene una amplia distribución en el sistema nervioso y se ha propuesto su participación en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Wynick et al., 2001, Wynick and Bacon, 2002), incluida la neurotransmisión del dolor (Xu et al., 1990, Wiesenfeld-Hallin et al., 1992, Zhang et al., 1998, Xu et al., 2000, Wiesenfeld-Hallin and Xu, 2001, Liu and Hökfelt, 2002, Wiesenfeld-Hallin et al., 2005) en varias especies, incluyendo

roedores, monos y humanos. Si bien numerosos autores se han dedicado a estudiar la expresión y la función de galanina en las neuronas aferentes primarias y en la médula espinal, tanto en condiciones normales como de injuria periférica, todavía no se ha podido determinar el rol exacto de este neuropéptido en el procesamiento de la información nociceptiva.

En condiciones normales, la galanina se expresa en un bajo número de neuronas aferentes primarias de pequeño tamaño (Ch'ng et al., 1985, Skofitsch and Jacobowitz, 1985). Sin embargo, estudios de inmunomarcación de las raíces dorsales y de los terminales nerviosos aferentes en el asta dorsal sugieren que alrededor del 50% de las neuronas sensitivas sintetizan galanina (Tuchscherer and Seybold, 1989, Klein et al., 1990, Zhang et al., 1993a), pero probablemente en bajos niveles. En consecuencia, pueden observarse numerosos terminales nerviosos inmunoreactivos para galanina, así como también interneuronas locales, fundamentalmente en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (Rokaeus et al., 1984, Ch'ng et al., 1985, Zhang et al., 1995).

En animales con diferentes tipos de lesión del nervio ciático se produce un incremento significativo en la expresión de galanina en los ganglios lumbares ipsilaterales (Hökfelt et al., 1987, Villar et al., 1989, Villar et al., 1991, Nahin et al., 1994, Ma and Bisby, 1997, Zhang et al., 1998, Shi et al., 1999). Se ha demostrado mediante estudios de hibridación *in situ* que este incremento se debe a una mayor tasa de transcripción (Villar et al., 1989). Luego de la injuria periférica se produce asimismo un aumento en la liberación de galanina en el asta dorsal, y esta liberación es aún mayor si se estimulan eléctricamente las fibras C (Colvin et al., 1997, Colvin and Duggan, 1998). De este modo, el aumento

en la síntesis de galanina en las neuronas aferentes primarias se traduce en un incremento en su transporte y liberación en el asta dorsal (Colvin et al., 1997, Colvin and Duggan, 1998). La síntesis de galanina en interneuronas espinales parece, por el contrario, sufrir pocos cambios luego de la injuria periférica (Zhang et al., 1998). En la sección “Resultados – Proyecto 2” de esta Tesis se describen los cambios observados en la expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias y la médula espinal lumbar de animales con compresiones de intensidad creciente del nervio ciático.

El rol que cumple la galanina en la neurotransmisión del dolor neuropático es sumamente complejo (Liu and Hökfelt, 2002, Holmes et al., 2005, Wiesenfeld-Hallin et al., 2005, Brumovsky et al., 2006b, Brumovsky et al., 2007). Es así que se le han atribuido tanto efectos inhibitorios (Yanagisawa et al., 1986, Cridland and Henry, 1988, Post et al., 1988, Wiesenfeld-Hallin et al., 1988, Wiesenfeld-Hallin et al., 1989a, Wiesenfeld-Hallin et al., 2005) como excitatorios (Wiesenfeld-Hallin et al., 1989a, Wiesenfeld-Hallin et al., 1989b, Kuraishi et al., 1991, Kerekes et al., 2003), ambos a bajas concentraciones, así como también un aumento de la inhibición luego de la injuria periférica (Wiesenfeld-Hallin et al., 1989b, Wiesenfeld-Hallin et al., 1992, Xu et al., 2000, Liu and Hökfelt, 2002, Hua et al., 2004, Wiesenfeld-Hallin et al., 2005). Por otra parte, se ha relacionado a la galanina con la sobrevida y la regeneración de las neuronas lesionadas (Kerr et al., 2000, Mahoney et al., 2003, Holmes et al., 2005, Shi et al., 2006a). Sin embargo, también se ha propuesto que podría estar contribuyendo a la generación del dolor neuropático luego de la injuria nerviosa (Ma and Bisby, 1997), y recientemente se ha mostrado que la infusión de bajas dosis de galanina produce una disminución del umbral del dolor (Kerr et al., 2000, Reeve et al., 2000).

Esta capacidad para mediar tanto acciones pro como antinociceptivas, probablemente se deba a la acción sobre distintos tipos de receptores (Xu et al., 2000, Wiesenfeld-Hallin and Xu, 2001, Liu and Hökfelt, 2002). Hasta el momento, se han clonado 3 subtipos de receptores de galanina (GalR): GalR1, GalR2 y GalR3 (Branchek et al., 1998, Iismaa and Shine, 1999, Branchek et al., 2000) y todos ellos se han detectado en los ganglios dorsales y en la médula espinal (Waters and Krause, 2000). En los GARDs, los transcritos primarios correspondientes a los receptores GalR1 y GalR2 se encuentran presentes en poblaciones neuronales de diferente tamaño (GalR1 en neuronas grandes y GalR2 en neuronas pequeñas), por lo general coexpresados junto con CGRP (Xu et al., 1996, Shi et al., 1997, Zhang et al., 1998, O'Donnell et al., 1999, Kerekes et al., 2003). El transcripto primario del GalR1 se ha detectado en alrededor del 75% de las neuronas aferentes primarias, mientras que el GalR2 se expresa en el 50% de las mismas (Shi et al., 1997, Zhang et al., 1998, Kerekes et al., 2003). En las láminas superficiales del asta dorsal, numerosas interneuronas locales contienen el transcripto del GalR1 (Parker et al., 1995, Gustafson et al., 1996, Zhang et al., 1998, O'Donnell et al., 1999). Por el contrario, el GalR2 se expresa muy débilmente en el asta dorsal (Zhang et al., 1998, O'Donnell et al., 1999, Waters and Krause, 2000), con una clara expresión en las motoneuronas del asta ventral (O'Donnell et al., 1999). Finalmente, los niveles del GalR3 son casi indetectables, tanto en los ganglios raquídeos como en la médula espinal (Smith et al., 1998, Waters and Krause, 2000).

En su cascada de señalización intracelular, el GalR1 se encuentra asociado a una proteína G del tipo G_i/G_o , y por lo tanto provoca una reducción en las concentraciones intracelulares del AMPc (Parker et al., 1995), apertura de canales de potasio

asociados a proteínas G (Smith et al., 1998) y activación de MAPKs (Wang et al., 1998b). Por su parte, el GalR2 se asocia a múltiples clases de proteínas G y estimula una gran variedad de vías de señalización intracelular (Lang et al., 2007). La más frecuentemente descrita involucra a una subunidad α q/11 de la proteína G (Wang et al., 1998a), que activa a la PLC, produciendo la activación subsecuente de la PKC (Fields and Casey, 1997, Bertaso et al., 2003) y el aumento de las concentraciones intracelulares de IP₃ y calcio (Taylor, 2002). Por lo tanto, la activación del GalR1 favorece la hiperpolarización celular, mientras que la activación del GalR2 causa un aumento de la excitabilidad neuronal, favoreciendo la liberación de neurotransmisores (Branchek et al., 1998, Iismaa and Shine, 1999, Branchek et al., 2000). Por último, el GalR3 se encuentra asociado a proteínas G del tipo G_i/G_o e induce disminución de los niveles de AMPc y apertura de canales de potasio asociados a proteínas G (Smith et al., 1998). Aún se desconoce cuál es el papel que juega el GalR3 en la neurotransmisión nociceptiva (Waters and Krause, 2000). En la Figura 6 se muestra una representación esquemática de las diferentes vías de señalización intracelular asociadas a los receptores GalR1, GalR2 y GalR3.

Óxido nítrico

Desde el siglo XIX, compuestos como la nitroglicerina y el nitroprusiato se utilizan en el tratamiento de la angina de pecho (Frau and Bergamasco, 1962, Hernandorena, 1963, Abrams, 1996, Nichols et al., 2007). En los comienzos, la práctica indicaba que la aplicación de estas sustancias resultaba en la relajación de la musculatura lisa vascular, permitiendo un mayor flujo de sangre al corazón (Frau and Bergamasco, 1962,

Hernandorena, 1963). Sin embargo, se desconocía por completo el mecanismo de acción de estas drogas y los mediadores involucrados en el proceso de vasodilatación. En 1980, el científico norteamericano Robert F. Furchgott, dedicado al estudio de los efectos de la acetilcolina sobre la musculatura vascular, describió la existencia del “factor de relajación derivado del endotelio” (EDRF, *Endothelium Derived Relaxing Factor*) (Furchgott and Zawadski, 1980). Experimentos posteriores lo llevaron a proponer que el EDRF era el NO (Furchgott et al., 1984, Martin et al., 1985), idea que fue comprobada por Louis Ignarro en 1987 (Ignarro et al., 1987). Ferid Murad completó estos descubrimientos, analizando el mecanismo de acción de la nitroglicerina y otras drogas vasodilatadoras, demostrando en 1977 que el compuesto activo liberado por las mismas es el NO, que activa la enzima guanilato ciclasa (GC) induciendo un aumento en los niveles de la forma cíclica del nucleótido guanosina monofosfato (GMPc), quien a su vez induce la relajación de las células musculares lisas (Katsuki et al., 1977). Los tres investigadores fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología en 1998 por sus valiosos aportes al conocimiento de la naturaleza y las propiedades del NO.

Además del endotelio vascular, una amplia variedad de tipos celulares producen NO, incluyendo las células epiteliales (Owens and Grisham, 1993, Tepperman et al., 1993), sanguíneas (Radomski et al., 1990, Gkaliagkousi et al., 2007), inflamatorias (Hibbs et al., 1987, Nathan and Hibbs, 1991) y nerviosas (Bredt et al., 1990, Forstermann et al., 1990). También son variadas las funciones que el NO realiza en cada uno de estos tejidos. Así, a nivel del endotelio vascular, el NO participa en el proceso de vasodilatación inducido por sustancias endógenas como la acetilcolina, la bradiquinina y la histamina, favoreciendo la relajación de la musculatura lisa de los vasos (Fiscus, 1988). A nivel

sanguíneo, el NO producido por las plaquetas actúa como antiagregante (Radomski et al., 1990). Su producción en macrófagos y neutrófilos se encuentra relacionada con los efectos citotóxicos inducidos en las células blanco, como la inhibición de la respiración mitocondrial y de la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Hibbs et al., 1987, Nathan and Hibbs, 1991). Finalmente, en el sistema nervioso, el NO actúa como mensajero celular participando en la transmisión sináptica y regulando los procesos de plasticidad sináptica como la potenciación y la depresión a largo plazo, así como la sinaptogénesis (Dawson et al., 1992, Dawson and Dawson, 1995, Hölscher, 1997). También se ha relacionado al NO con la regulación del flujo sanguíneo cerebral, los fenómenos de tolerancia y dependencia a drogas, y la regulación de vías sensitivas y motoras (Dawson et al., 1992, Dawson and Dawson, 1995). El NO es capaz de modular distintas funciones neurales como el aprendizaje y la memoria, la regulación neuroendócrina, la conducta sexual, la ingesta y la neurotransmisión del dolor (Dawson et al., 1992, Dawson and Dawson, 1995). Desde el punto de vista patológico, la producción excesiva de NO tiene efectos citotóxicos, generalmente relacionados a la producción de peroxinitros que generan daño oxidativo y pueden ocasionar la muerte neuronal (Dawson et al., 1992, Dawson and Dawson, 1995).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por una enzima, la sintasa de óxido nítrico (NOS), liberando L-citrulina como subproducto (Moncada et al., 1989, Bredt and Snyder, 1990). Para la síntesis de NO, además del sustrato L-arginina, se requiere de la presencia de calmodulina y de cuatro cofactores: mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavina adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (THB) y fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina

(NADPH) (Bredt and Snyder, 1990, Alderton et al., 2001). La síntesis de NO puede ser inhibida por derivados estructurales de la L-arginina, como la N-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) y el metilester de N-nitro-L-arginina (L-NAME), entre otras sustancias (Moncada et al., 1991, Alderton et al., 2001).

Se conocen tres isoformas de la NOS, una inducible (iNOS) e independiente de calcio (en plaquetas, macrófagos, hepatocitos, músculo liso y endotelio), y dos constitutivas y dependientes de calcio, presentes en células endoteliales (eNOS) y en neuronas (nNOS) (Alderton et al., 2001). Las isoformas constitutivas median la producción de bajas cantidades de NO, mientras que las enzimas inducibles lo producen en grandes cantidades (Moncada et al., 1991). Como su nombre lo indica, la expresión de las enzimas inducibles se produce en respuesta a ciertos estímulos. Así, por ejemplo, la NOS plaquetaria y la NOS macrofágica se expresan muy débilmente en plaquetas o macrófagos en estado basal, mientras que sus niveles de expresión aumentan notablemente al ocurrir la activación celular (Gkaliagkousi et al., 2007). Por su parte, las isoformas constitutivas permanecen inactivas hasta que se produce un aumento en la concentración intracelular de calcio (Moncada et al., 1991, Alderton et al., 2001). Este catión divalente regula la unión de la calmodulina a la NOS, permitiendo la síntesis de NO (Moncada et al., 1991, Alderton et al., 2001). Numerosos neurotransmisores son capaces de iniciar señales que resultan en un incremento de la concentración de calcio. En particular, la acción del glutamato sobre sus receptores NMDA y kainato induce la activación de la NOS, derivando en la producción de NO (Garthwaite et al., 1988, Garthwaite et al., 1989a, Garthwaite et al., 1989b, Kawamata and Omote, 1999).

Los efectos biológicos del NO se encuentran mediados por la enzima GC, a la cual el NO se une, induciendo su activación y la consiguiente producción de GMPc a partir del trifosfato de guanósina (GTP). El GMPc activa proteínas quinasas G (PK_G) que fosforilan proteínas blanco. En la Figura 7 se muestra una representación esquemática de los eventos celulares relacionados a la activación de la nNOS y los diferentes mediadores involucrados en la vía de señalización del NO.

Como ya se mencionó, en el sistema nervioso el NO actúa como mensajero intercelular (Dawson et al., 1992). Sin embargo, por su naturaleza gaseosa, el NO tiene propiedades diferentes a las de otros neurotransmisores: no se puede almacenar en vesículas sinápticas para ser luego exocitado, sino que se sintetiza en el momento y difunde rápidamente (Dawson et al., 1992). Por esta capacidad de difundir libremente a través de las membranas, no requiere la presencia de receptores de superficie en las células diana. Se trata por tanto de una molécula señal que puede ser liberada desde cualquier parte de la neurona (donde se encuentre la enzima de síntesis) y actuar sobre la misma célula que la produce o difundir a neuronas o células gliales adyacentes, actuando como regulador autócrino o parácrino (Gally et al., 1990, Dawson et al., 1992, Morris et al., 1992). Además de este rol como neurotransmisor “clásico”, se ha sugerido que actuaría como transmisor retrógrado, es decir, el NO producido en la postsinapsis en respuesta a la activación de un cierto receptor, difunde rápidamente hacia el terminal presináptico, modulando la excitabilidad neuronal y la actividad sináptica (Baringa, 1991, Dawson et al., 1992).

Debido a que el NO no puede almacenarse como ocurre con el resto de los neurotransmisores, la regulación de la enzima que cataliza su síntesis es muy

importante. De hecho, la NOS se encuentra más estrechamente regulada que cualquier otra enzima que participa en la síntesis de neurotransmisores (Brenman et al., 1997, Andrew and Mayer, 1999, Alderton et al., 2001). Esta regulación se basa en un estrecho control tanto a nivel transcripcional como de la actividad de la enzima (Brenman et al., 1997, Andrew and Mayer, 1999, Alderton et al., 2001). Se ha descrito que la expresión de la nNOS está sujeta a una fina regulación que resulta en la producción de diferentes transcritos primarios, que a su vez se traducen en proteínas funcionales o no funcionales (Brenman et al., 1997). Por otra parte, como se explicó en párrafos anteriores, la reacción catalizada por la NOS es sumamente compleja, y la actividad de la enzima se encuentra regulada por numerosos factores (Alderton et al., 2001). Como consecuencia, la expresión y la actividad de la enzima no siempre se correlacionan (Broholm et al., 2003).

En el cerebro de la rata, la máxima actividad de la NOS se ha detectado en cerebelo, hipotálamo, cuerpo estriado e hipocampo (Forstermann et al., 1990). Por el contrario, su expresión en neuronas aferentes primarias es muy baja, limitándose a un escaso número de neuronas de pequeño tamaño (Aimi et al., 1991, Zhang et al., 1993b). En la médula espinal, la inmunoreactividad para la enzima puede detectarse en abundantes fibras, terminales nerviosos e interneuronas locales del asta dorsal, así como en neuronas de gran tamaño localizadas alrededor del canal central (Valtschanoff et al., 1992a, Zhang et al., 1993b). Se ha descrito que luego de diferentes tipos de injuria del nervio ciático, se produce un marcado incremento en los niveles de expresión de la nNOS en las neuronas afrentes primarias (Verge et al., 1992a, Fiallos Estrada et al., 1993, Zhang et al., 1993b, Shi et al., 1998a). Sin embargo, se desconoce, si este aumento en la expresión de la enzima se traduce en una mayor producción de NO. En la sección “Resultados – Proyecto 3” de

esta Tesis, se presentan los datos obtenidos al analizar la expresión de la enzima y la producción de NO en los GARDs y la médula espinal de animales sometidos a una axotomía de su nervio ciático.

Conocer los niveles de NO es de fundamental importancia ya que se ha sugerido que la mediación de funciones excitatorias o inhibitorias por parte de este mensajero gaseoso depende de sus niveles de producción (Segieth et al., 1995, Zochodne and Levy, 2005). Se ha propuesto que el NO producido en respuesta a una injuria periférica ejerce efectos protectores sobre las neuronas dañadas (Thippeswamy and Morris, 1997a, Thippeswamy et al., 2001a, Thippeswamy et al., 2005), participando en las vías de señalización antiapoptóticas (Chung et al., 2001, Thippeswamy et al., 2001b) y favoreciendo el establecimiento de conexiones sinápticas apropiadas luego de la transección nerviosa (Van Wangenen and Rehder, 2001), contribuyendo a la regeneración neural (Cristino et al., 2000). Por otra parte, se ha involucrado al NO en la muerte de neuronas nNOS positivas (Zochodne et al., 1997) y en la mediación de mecanismos proapoptóticos (Heneka et al., 1998). Incluso se ha propuesto que el aumento sostenido en la producción de NO en la médula espinal luego de una injuria periférica media la hiperalgesia térmica asociada a la misma (Meller et al., 1992). Como se puede apreciar, el rol de este modulador gaseoso en la neurotransmisión nociceptiva es sumamente complejo, lo que amerita nuevos estudios que aporten los datos necesarios para comprender su acción en situaciones fisiológicas y patológicas.

Tratamiento del dolor neuropático

No existen hasta el presente terapias altamente efectivas y bien toleradas para el control del dolor neuropático (Orza et al., 2000, Galluzi, 2005). Los analgésicos comunes como los anti-inflamatorios no esteroideos (aspirina, ibuprofeno) tienen mínimo efecto. Tradicionalmente, los clínicos han recurrido a anticonvulsivantes o antidepresivos que actúan a través de mecanismos no específicos causando depresión central, a la vez que producen una variedad de efectos colaterales no deseados (Orza et al., 2000, Gilron et al., 2006).

A continuación se nombran algunos fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de pacientes con dolor neuropático:

- **Antidepresivos:** Los antidepresivos tricíclicos como la amitriptilina han demostrado ser los fármacos más eficaces en el tratamiento del dolor neuropático (Sindrup and Jensen, 1999, Coluzzi and Mattia, 2005, Sindrup et al., 2005, Saarto and Wiffen, 2006). Tienen un amplio espectro de mecanismos de acción pero fundamentalmente actúan bloqueando la recaptación de noradrenalina y serotonina, aumentando de esta forma su disponibilidad a nivel sináptico (Abdi et al., 1998, Sindrup and Jensen, 1999, Coluzzi and Mattia, 2005, Sindrup et al., 2005). Recordemos que ambos neurotransmisores participan en la inhibición descendente de las vías nociceptivas (Basbaum and Fields, 1984). Lamentablemente, su uso está limitado por tener un comienzo de acción tardío, potencial toxicidad cardíaca y efectos adversos.

- Anticonvulsivantes: Los fármacos antiepilépticos constituyen, junto a los antidepresivos tricíclicos, fármacos de primera línea en el tratamiento del dolor neuropático (Eisenberg et al., 2007). La carbamacepina y la fenitoína bloquean canales de sodio voltaje-dependientes, mientras que la gabapentina y la pregabalina actúan como antagonistas de los canales de calcio voltaje-dependientes (Eisenberg et al., 2007). Tanto carbamacepina como fenitoína presentan importantes efectos adversos mientras que, por lo general, gabapentina y pregabalina son bien toleradas (Eisenberg et al., 2007).

- Opioides: Los opioides morfina, oxycodona, tramadol y metadona tienen demostrada eficacia en el tratamiento del dolor neuropático (Raja et al., 2002, Kalso, 2005, Rowbotham, 2005). Estos fármacos mimetizan los efectos inhibitorios de las encefalinas, endorfinas y dinorfinas endógenas (Galluzi, 2005). Sus efectos adversos se relacionan con los fenómenos de tolerancia, abuso y adicción que pueden generar (Raja et al., 2002, Kalso, 2005, Rowbotham, 2005).

- Bloqueantes de canales de sodio: La droga prototipo de este grupo es la lidocaína, cuya principal limitante es la imposibilidad de administrarla en forma oral, por lo que se la administra en forma intravenosa o como anestésico tópico, fundamentalmente en forma de parches, para el tratamiento de neuropatías periféricas (Katz et al., 2002, Gammaitoni et al., 2003, Davies and Galer, 2004, Nalamachu et al., 2006).

- Antagonistas del receptor NMDA: Las drogas actualmente disponibles (ketamina y dextrometorpan) tienen una eficacia reducida y producen severos efectos

adversos a nivel del sistema nervioso central, fundamentalmente psicotomiméticos (Mercadante et al., 2000), por lo que su uso clínico se ve severamente limitado.

- Analgésicos de uso tópico: Pueden utilizarse parches de lidocaína (Katz et al., 2002, Gammaitoni et al., 2003, Davies and Galer, 2004, Nalamachu et al., 2006), así como cremas conteniendo capsaicina (McCleane, 2000), únicamente para pacientes con dolor circunscripto a una pequeña región.

Si bien estos tratamientos pueden ser medianamente efectivos en algunos pacientes, carecen de efecto en otros (Orza et al., 2000, Galluzi, 2005). Muchas veces el uso combinado de drogas produce un efecto sinérgico, aumentando significativamente la efectividad del tratamiento (Raja et al., 2002, Gilron et al., 2005, Kalso, 2005). En casos de dolor refractario, puede ser necesario recurrir a medidas invasivas como inyecciones locales de anestésicos o corticoides a nivel epidural o perineural, implantación de sistemas de liberación de drogas a nivel epidural o intratecal, inserción de estimuladores de la médula espinal, estimulación eléctrica de los nervios periféricos o de la corteza motora, entre otros procedimientos (Gilron et al., 2006).

El objetivo primario del tratamiento de los pacientes con cuadros de dolor neuropático es disminuir o, si es posible, eliminar el dolor. Incluso una reducción del 30% del dolor es clínicamente significativa para estos pacientes. La disminución del dolor permite mejorar los síntomas asociados como los trastornos del sueño, la ansiedad y la depresión. De este modo, mejoran todos los aspectos de la vida del paciente:

funcionamiento físico, estado general de salud, humor, relaciones sociales y actividad laboral.

Células estromales de médula ósea

La falta de terapias efectivas y bien toleradas para el tratamiento del dolor neuropático (Orza et al., 2000, Galluzi, 2005) hace que el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas sea una necesidad concreta y a la vez imperiosa (Gilron et al., 2006). En los últimos años, la posibilidad de realizar terapias celulares utilizando células madre ha captado la atención de la comunidad científica y médica internacional (Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Cova et al., 2004, Mimeault and Batra, 2006, Zietlow et al., 2007). Si bien los inconvenientes e incógnitas con respecto a la aplicación de células pluri o multipotentes siguen siendo muchos, las posibilidades y ventajas que ofrece este tipo de tratamiento son realmente fascinantes: nada más y nada menos que la reparación de los tejidos (Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Cova et al., 2004, Mimeault and Batra, 2006, Biernaskie et al., 2007, Zietlow et al., 2007).

Es sabido que el sistema nervioso central tiene escasas posibilidades de autoreparación (Zietlow et al., 2007). Si bien existen células madre neurales en el adulto, su capacidad de generación de nuevas neuronas funcionales en respuesta al daño neural, es limitada (Zietlow et al., 2007). En cuanto al sistema nervioso periférico, la regeneración axonal luego de una injuria puede ocurrir luego del proceso de degeneración walleriana, por la proliferación y la activación de las células de Schwann (Hall, 2001, Hall, 2005). Estas últimas producen una gran variedad de factores neurotróficos y citoquinas, y

expresan moléculas de adhesión y proteínas extracelulares que permiten la regeneración del axón (Fu and Gordon, 1997, Chernousov and Carey, 2000). La utilización de células de Schwann que permitan la regeneración nerviosa se ha estudiado en modelos animales, pero su aplicación clínica se ve frenada por la dificultad de obtener grandes cantidades de estas células (Pluchino and Martino, 2005, Kingham et al., 2007). Por otra parte, para obtener células de Schwann para autotransplante otro nervio debe ser sacrificado (Kingham et al., 2007). De ahí la búsqueda de fuentes alternativas de células (Pluchino and Martino, 2005, Kingham et al., 2007). Una posible opción la constituyen las células madre que puedan diferenciarse a fenotipos neurales (Prockop, 1997, Jiang et al., 2002, Du and Zhang, 2004, Bonilla et al., 2005, Blondheim et al., 2006, Biernaskie et al., 2007, Kingham et al., 2007, Zietlow et al., 2007).

Se han identificado en la médula ósea dos poblaciones diferentes de células madre adultas multipotenciales, las hematopoyéticas (CMH) y las mesenquimáticas o estromales (CMM) (Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Short et al., 2003). Las CMM representan alrededor del 0.001% del total de células de la médula ósea y su progenie se encarga de crear el microambiente adecuado para favorecer la autorenovación, la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas (Owen and Friedenstein, 1988, Blanco et al., 2001, Short et al., 2003). Las CMM dar origen a células estromales (fibroblastos, adipocitos, células del endotelio vascular), condrocitos, osteocitos y células musculares lisas (Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Short et al., 2003). Además de diferenciarse y desdiferenciarse, las CMM presentan la capacidad de transdiferenciarse a células de otro linaje distinto al mesenquimal (Prockop, 1997, Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Bonilla et al., 2005, Blondheim et al., 2006), pudiendo dar origen a cardiomiocitos

(Shim et al., 2004), hepatocitos (Shu et al., 2004) o neuronas (Woodbury et al., 2000).

Las células hematopoyéticas y mesenquimáticas de médula ósea pueden ser separadas fácilmente, ya que al colocarlas en una placa de cultivo las primeras permanecen en el sobrenadante mientras que las segundas se adhieren al plástico (Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Short et al., 2003). Las células que permanecen adheridas a la placa se conocen como células estromales de médula ósea (CEMO), población que incluye a las CMM, a los progenitores estromales y a las células estromales maduras. Bajo ciertas condiciones de cultivo, se ha logrado promover la diferenciación de las CEMO a células que expresan marcadores neurales como nestina y NeuN, y presentan una morfología compatible con neuronas (Woodbury et al., 2000, Abouelfetouh et al., 2004). Asimismo, se ha demostrado la diferenciación *in vitro* de las CEMO a células con morfología y expresión de los marcadores p75, S₁₀₀, O₄ y proteína acídica fibrilar glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) característicos de las células de Schwann (Mezey et al., 2000, Sanchez-Ramos et al., 2000, Mimura et al., 2004, Suzuki et al., 2004). Al ser colocadas en un injerto artificial en el nervio ciático axotomizado de ratas Wistar, estas células de Schwann diferenciadas a partir de las CEMO promueven la regeneración neural, posibilitando la conexión de los extremos proximal y distal del nervio seccionado en el plazo de 6 meses (Mimura et al., 2004). En estos animales se observa asimismo una mejora significativa en los estudios de motricidad, así como también en los de electrofisiología, al compararlos con animales controles (Mimura et al., 2004). Las células transplantadas comienzan a expresar marcadores de células de Schwann maduras como P₀ y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG, *Myelin-Associated Glycoprotein*) (Mimura et al., 2004). La administración local de CEMO indiferenciadas en el extremo distal

del nervio ciático seccionado también acelera la recuperación motora de los animales (Cuevas et al., 2002, Cuevas et al., 2004, Chen et al., 2007).

Por otra parte, estudios recientes han mostrado la capacidad de migración e implantación de las CEMO en el sistema nervioso: la infusión sistémica de CEMO marcadas en ratones irradiados produce un influjo continuo de estas células al cerebro (Eglitis and Mezey, 1997). Más aún, recientemente se ha demostrado que las CEMO participan activamente en los procesos de regeneración del sistema nervioso central, promoviendo la recuperación funcional de animales con diferentes tipos de daño neurológico (Chen et al., 2001, Lu et al., 2001b, Mahmood et al., 2004, Ohta et al., 2004, Zurita and Vaquero, 2004, Neuhuber et al., 2005). Por ejemplo, luego de la inyección intravascular de CEMO en un modelo de injuria cerebral traumática, se observa una migración selectiva de las CEMO al hemisferio cerebral lesionado, con aumento en la expresión local de factores neurotróficos (Mahmood et al., 2004), y mejora funcional de estos animales al ser evaluados en su función neurológica (Lu et al., 2001b, Mahmood et al., 2004). Una vez implantadas en el cerebro lesionado, las CEMO comienzan a expresar marcadores neuronales (NeuN) y astrocíticos (GFAP) (Lu et al., 2001b).

Las CEMO diferenciadas o sin diferenciar son candidatas para ser utilizadas en el trasplante de células para la regeneración del sistema nervioso central y periférico (Prockop, 1997, Prockop et al., 2000, Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Bonilla et al., 2005, Blondheim et al., 2006). Las CEMO cuentan con varias ventajas para su aplicación en terapia celular, como su accesibilidad, ya que pueden obtenerse por medio de una punción de médula ósea, su relativamente fácil cultivo y diferenciación *in vitro*, y la

posibilidad de realizar trasplantes autólogos, dejando a un lado los problemas de carácter inmunológico o ético (Prockop, 1997, Blanco et al., 2001, Jiang et al., 2002, Bonilla et al., 2005). En la sección “Resultados – Proyecto 4” se exponen los datos obtenidos al analizar la participación de las CEMO en un modelo animal de dolor neuropático, evaluando su migración hacia el sitio de injuria, su efecto sobre la conducta nociceptiva de los animales y su efecto sobre la expresión de neuropéptidos y neuromoduladores involucrados en la neurotransmisión nociceptiva.

Oligonucleótidos inmunomoduladores

Los oligodeoxinucleótidos (ODNs) sintéticos son secuencias cortas de ADN simple cadena. Durante los años 80 se comenzaron a utilizar como secuencias antisentido con el fin de bloquear la expresión de determinados genes (Stein and Cohen, 1988), fundamentalmente aquellos que codifican para proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular (Heikkila et al., 1987, Jaskulski et al., 1988), pensando en su aplicación en el tratamiento de ciertas enfermedades como el cáncer (Paoletti, 1988, Wickstrom et al., 1988, Zon, 1988). Casi simultáneamente, se comenzaron a sintetizar ODNs que permitieran neutralizar los ácidos nucleicos de determinados virus, como el virus del mosaico del tabaco (Crum et al., 1988), el virus Epstein Baar (Yao et al., 1993), el de la hepatitis B (Moriya et al., 1996) y el VIH (Goodchild et al., 1988) entre otros, con el objeto de ser utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por dichos agentes.

En la década de los 90, se descubrió la capacidad de ciertos ODNs de estimular el sistema inmune de vertebrados (McIntyre et al., 1993, Branda et al., 1996, Krieg, 1999,

Agrawal and Kandimalla, 2001). Cuando se analizó la estructura de los ODNs inmunoestimulantes, se descubrió que dicha actividad estaba directamente relacionada con la presencia de secuencias CpG desmetiladas, ubicadas en un cierto contexto dentro de la molécula (Boggs et al., 1997, Krieg, 1999, Ballas et al., 2001). Algunos años más tarde, se descubrió que determinados ODNs sin secuencias CpG también presentaban actividad inmunomoduladora (Elías et al., 2003). Estos últimos tienen al menos un sitio activo con la secuencia PyNTTTTGT, en donde Py (pirimidina) puede ser C (citosina) o T (timina), y N (nucleótido) puede ser A (adenina), T, C o G (guanina) (Elías et al., 2003). El IMT504 (Immunotech S.A.), un ODN de 24 nucleótidos con dos motivos consecutivos CATTTTGT en su secuencia, es el prototipo de esta familia de ODNs (Elías et al., 2003).

A diferencia de los ODNs del tipo CpG, que son activos en varias especies de vertebrados (Rankin et al., 2001), los ODNs del tipo PyNTTTTGT, y en particular el IMT504, presentan actividad fundamentalmente en primates (hombres, monos) (Elías et al., 2003) y roedores (ratas) (Elías et al., 2005). Ambas familias de ODNs tienen la capacidad de inducir la activación y la proliferación de linfocitos B (L_B) y de células dendríticas plasmocitoides, estimulando la producción de inmunoglobulinas y la expresión de moléculas coestimuladoras (Krieg, 1999, Hartmann and Krieg, 2000, Ballas et al., 2001, Elías et al., 2003, Elías et al., 2005). De esta forma promueven la respuesta inmune tanto humoral como celular frente a variedad de antígenos, actuando como potentes adyuvantes de vacunas (Lipford et al., 1997, Weeratna et al., 2000, Elías et al., 2005). En particular, se ha demostrado un aumento significativo en la producción de anticuerpos específicos y activación de la respuesta de linfocitos T helper 1 (L_{Th1}) al administrar el IMT504 junto con el antígeno de superficie recombinante de la vacuna de hepatitis B (Elías et al.,

2005). Las propiedades inmunomoduladoras de ambas familias de ODNs han sugerido su uso en modelos animales de alergia y cáncer, en los que han probado tener efectos beneficiosos (Wooldridge et al., 1997, Kline et al., 1998, Magone et al., 2000, Rodríguez et al., 2006). En particular, el IMT504 induce la adquisición de un fenotipo inmunogénico y la entrada en apoptosis de L_B de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Rodríguez et al., 2006).

Además de sus propiedades inmunomoduladoras, el IMT504 tiene la capacidad de estimular la proliferación y la movilización de las CMM (Hernando Insúa et al., 2007). Estudios *in vitro* han demostrado que cuando células mononucleares (CMN) de médula ósea, tanto de origen murino como humano, son incubadas en presencia del IMT504, se produce un aumento significativo en el número de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-Fs), indicadoras del número de CMM presentes (Hernando Insúa et al., 2007). Asimismo, estudios *in vivo* en animales de experimentación, muestran que la administración del IMT504 induce un incremento en el número de CMM, tanto en la propia médula ósea, como en la circulación periférica (Hernando Insúa et al., 2007). Estos resultados permiten suponer que la inducción de la proliferación de las CMM también ocurrirá al administrar el IMT504 directamente a los pacientes, abriendo la posibilidad de su aplicación en terapéutica humana. Al respecto, el IMT504 ha demostrado ser una droga segura en los estudios de toxicidad realizados como parte de los ensayos pre-clínicos indicados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

En la sección “Resultados – Proyecto 5” se muestran los datos obtenidos al evaluar el efecto de la administración del IMT504 sobre la conducta nociceptiva y la expresión de neuropéptidos y neuromoduladores en animales con una compresión mecánica aguda de su nervio ciático.

Objetivos

Objetivos generales

Como ya se mencionó en la Introducción, los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la generación y el mantenimiento del dolor neuropático distan de estar esclarecidos. Profundizar en el estudio de los mediadores que participan en la neurotransmisión nociceptiva es de fundamental importancia ya que este conocimiento redundará en una mejor comprensión de los mecanismos responsables del dolor y permitirá el diseño y la utilización de terapias apropiadas. En consecuencia, el objetivo principal de la presente Tesis es evaluar la participación de neuropéptidos y neuromoduladores en la neurotransmisión del dolor, estudiando en particular la expresión de NPY (Proyecto 1) y galanina (Proyecto 2) y la producción de NO (Proyecto 3) en las neuronas aferentes primarias y la médula espinal lumbar de animales controles y sometidos a diferentes tipos de lesión de su nervio ciático.

Por otra parte, teniendo en cuenta la falta de terapias efectivas y bien toleradas para el tratamiento de los pacientes con dolor neuropático, el segundo objetivo de esta Tesis es evaluar el efecto de la administración de terapias celulares y moleculares, en particular CEMO (Proyecto 4) e IMT504 (Proyecto 5), a animales con dolor neuropático, analizando la conducta nociceptiva de los mismos y la expresión de neuropéptidos y neuromoduladores.

A fin de cumplir con estos objetivos se diseñaron cinco proyectos experimentales, cada uno con sus propios objetivos específicos, que se presentan a continuación.

Proyecto 1: Efecto de la inyección intraneural de colchicina sobre la expresión del NPY y su receptor Y_1 en las neuronas aferentes primarias

Como ya se mencionó en la Introducción, la colchicina es un potente inductor de la despolimerización de los microtúbulos que constituyen el citoesqueleto (Weisenberg et al., 1968, Strott and Ray, 1977), y por lo tanto, actúa como agente bloqueante del transporte axonal (Weisenberg et al., 1968, Strott and Ray, 1977, Ginn and Peterson, 1992), impidiendo el transporte de moléculas desde el soma neuronal hacia la periferia, y viceversa (Strott and Ray, 1977, Ginn and Peterson, 1992). En condiciones normales, factores neurotróficos producidos por los tejidos inervados son trasladados utilizando este sistema de transporte a lo largo de las proyecciones periféricas de las neuronas aferentes primarias hacia los cuerpos neuronales alojados en los GARDs (McMahon and Priestley, 1995), donde, se ha postulado, regulan la expresión de neuropéptidos (Verge et al., 1995).

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la inyección intraneural de colchicina induce la degeneración axonal, observándose una redistribución de las proteínas axonales y de mielina que pierden el patrón fibrilar característico de nervios controles para agruparse en acúmulos ovoides (Aquino et al., 2006). La cantidad de acúmulos observados aumenta en forma directamente proporcional a la concentración de la solución de colchicina inyectada (5, 10 o 20 mM) (Aquino et al., 2006). Por otra parte, la administración de colchicina induce cambios en la conducta nociceptiva de los animales, observándose una disminución en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos y térmicos, con generación de alodinia (resultados no publicados).

En base a estos antecedentes, los objetivos del presente proyecto fueron:

- a) Evaluar si el bloqueo del transporte axonal inducido por colchicina genera cambios en la expresión del NPY y su receptor Y_1 en las neuronas aferentes primarias.
- b) Determinar si la administración de soluciones de colchicina de concentración creciente (5, 10 o 20 mM) modifica los niveles de expresión del neuropéptido y su receptor.
- c) Realizar una curva de tiempo, estudiando la expresión del NPY y el Y_1 luego de diferentes tiempos de producida la injuria (1, 3, 7, 14, 21 y 28 días).
- d) Relacionar los resultados obtenidos con las alteraciones detectadas en la expresión de proteínas axonales y de mielina en el nervio periférico y los cambios en la conducta nociceptiva de los animales.

Proyecto 2: Expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias de animales con diferentes grados de compresión de su nervio ciático

El modelo de compresión crónica del nervio ciático mediante una ligadura única fue desarrollado en nuestro laboratorio por Pablo R. Brumovsky (Brumovsky et al., 2004). Este modelo, también denominado de compresión única del nervio periférico (CUNP), se basa en el modelo de Bennett y Xie, que consiste en 4 ligaduras realizadas alrededor del nervio ciático utilizando hilo de sutura (Bennett and Xie, 1988). Sin embargo, la CUNP cuenta con varias ventajas: como lo indica su nombre, implica una única ligadura, importante beneficio desde el punto de vista operativo y de la reproducibilidad. Por otra parte, utiliza una banda de polietileno colocada entre el nervio y el hilo de sutura que logra reducir la reacción inflamatoria, permitiendo de este modo discriminar los procesos puramente neuropáticos. Finalmente, permite realizar compresiones graduables y controladas del nervio ciático, logrando reducciones del 10-30% de su diámetro (CUNP suave), del 40-80% (CUNP moderada) o mayores al 90% (CUNP intensa) (Brumovsky et al., 2004).

Utilizando este modelo, se demostró que compresiones de intensidad creciente se relacionan con un progresivo aumento en el número de neuronas aferentes primarias que expresan NPY, así como con una progresiva disminución en el número de neuronas Y_1 -IR (Brumovsky et al., 2004). Por otra parte, la CUNP induce cambios en la conducta nociceptiva de los animales (se describen en la sección Resultados), y estos cambios también se relacionan con el grado de compresión del nervio (Brumovsky et al., 2004).

El objetivo general de este proyecto fue aportar nuevos datos que permitieran completar la información disponible sobre el modelo de CUNP, evaluando, el patrón de expresión de otro neuropéptido involucrado en los procesos nociceptivos, la galanina, en los ganglios raquídeos y la médula espinal lumbar de animales con compresiones de diferente intensidad de su nervio ciático.

Los objetivos específicos fueron:

- a) Determinar si la compresión crónica del nervio ciático mediante una ligadura única induce cambios en la expresión del neuropéptido galanina en los ganglios raquídeos y en la médula espinal lumbar.
- b) Evaluar el efecto del grado de compresión del nervio sobre los niveles de expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias, cuantificando el número de neuronas inmunoreactivas en animales con CUNP suave, moderada o intensa.
- c) Estudiar la evolución temporal del cambio en la expresión del neuropéptido, evaluando animales a los 7, 14, 30 y 60 días de producida la lesión.
- d) Comparar los resultados obtenidos con los cambios previamente descritos en la conducta nociceptiva de los animales y en la expresión del NPY y su receptor Y_1 .

Proyecto 3: Expresión de la enzima nNOS y producción de NO en los GARDs y la médula espinal de animales con axotomía de su nervio ciático

Como se mencionó en la Introducción, el NO es un neuromodulador involucrado en la neurotransmisión nociceptiva al que se le han atribuido funciones tanto pro como antinociceptivas (Meller et al., 1990, Meller and Gebhart, 1993, Levy and Zochodne, 2004, Zochodne and Levy, 2005, Naik et al., 2006). Su síntesis es catalizada por la enzima nNOS (Bredt and Snyder, 1990), que en condiciones normales se encuentra presente en un bajo porcentaje de neuronas aferentes primarias (Aimi et al., 1991, Zhang et al., 1993b) y en interneuronas locales del asta dorsal de la médula espinal (Zhang et al., 1993b). La lesión del nervio ciático induce un marcado incremento en la inmunoreactividad de la enzima en los ganglios y en la médula lumbar (Zhang et al., 1993b, Shi et al., 1998a). Sin embargo, se desconoce si este aumento en la expresión de la enzima se traduce en un aumento en la producción de NO. Como ya se adelantó, la expresión y la actividad de esta enzima no siempre se correlacionan (Broholm et al., 2003). Conocer los niveles de NO es de fundamental importancia ya que se ha sugerido que la mediación de funciones excitatorias o inhibitorias depende de sus niveles de producción (Segieth et al., 1995).

Al tener un electrón desapareado, el NO se comporta como un radical libre y es muy reactivo; en consecuencia tiene una vida media muy breve, del orden de los milisegundos a segundos (Ignarro, 1989). Luego de ser liberado y de ejercer sus efectos se descompone espontáneamente generando dos metabolitos estables, los iones nitrito y nitrato (Ignarro, 1989, Ignarro et al., 1993). Las concentraciones de estos óxidos de nitrógeno se correlacionan con la actividad de la NOS, y su determinación tanto *in vivo*

como *ex vivo*, se utiliza como un índice cuantitativo de la producción de NO (Salter et al., 1996, Yamada and Nabeshima, 1997).

El objetivo de este proyecto fue estudiar la producción de NO en los GARDs y la médula espinal lumbar de animales con axotomía de su nervio ciático, y correlacionar los niveles del neuromodulador con la expresión de la enzima nNOS.

Los objetivos específicos propuestos fueron:

- a) Determinar los cambios en la expresión de la enzima nNOS en los GARDs y la médula espinal lumbar de animales con axotomía de su nervio ciático.
- b) Estudiar la evolución temporal de los cambios inducidos en la expresión de la enzima luego de la injuria, evaluando animales luego de 7, 14, 28, 35 y 42 de producida la lesión.
- c) Evaluar si la enzima sintetizada en respuesta a la injuria se encuentra activa y es funcional, determinando los niveles de nitritos y nitratos en los GARDs y las porciones ipsi y contralaterales de la médula espinal lumbar luego de diferentes tiempos de inducida la lesión.

Proyecto 4: Rol de las CEMO en modelos animales de dolor neuropático

En los últimos años, se han estudiado los efectos de la administración de CEMO en modelos animales de injuria cerebral traumática, (Lu et al., 2001a, Lu et al., 2001b, Mahmood et al., 2004), isquemia (Chen et al., 2001) o infarto (Lee et al., 2003) cerebral, contusión (Ohta et al., 2004, Zurita and Vaquero, 2004) o hemisección (Neuhuber et al., 2005) de la médula espinal y axotomía del nervio ciático (Cuevas et al., 2002, Cuevas et al., 2004, Zhang et al., 2004, Chen et al., 2007). Estos estudios han permitido demostrar la participación activa de las CEMO en los procesos de regeneración con recuperación de la actividad motora de los animales (Chen et al., 2001, Lu et al., 2001a, Cuevas et al., 2002, Lee et al., 2003, Mahmood et al., 2004, Ohta et al., 2004, Zhang et al., 2004, Zurita and Vaquero, 2004, Neuhuber et al., 2005, Chen et al., 2007). Sin embargo, se desconoce si la administración de CEMO tiene algún efecto sobre las alteraciones nociceptivas y los cambios neuroquímicos que caracterizan a los cuadros de dolor neuropático.

En base a estos interrogantes, nos planteamos analizar la participación de las CEMO en nuestros modelos animales de dolor neuropático. Para ello, nos propusimos estudiar animales con una lesión crónica de su nervio ciático, capaz de inducir cambios importantes en la conducta nociceptiva y en la expresión de moléculas involucradas en la neurotransmisión del dolor, a fin de poder evaluar el efecto de la administración exógena de CEMO sobre ambos parámetros. Fue por ello que decidimos estudiar animales con CUNP moderada e inyección intraganglionar (i.g.) de CEMO, a fin de asegurar la interacción de las células con las neuronas aferentes primarias. Teniendo en cuenta el comportamiento de las CEMO en otros modelos de lesión, también nos propusimos

evaluar su migración a los ganglios raquídeos afectados por la injuria, su diferenciación a células con fenotipo neural y su efecto sobre la producción local de factores tróficos.

En consecuencia, los objetivos específicos del presente proyecto fueron:

- a) Evaluar si las CEMO administradas en el ganglio raquídeo lumbar 4 (L4) de animales con CUNP moderada de su nervio ciático migran hacia los otros ganglios lumbares afectados por la injuria.

- b) Estudiar las señales que participan en la migración de las CEMO, evaluando la expresión en los GARDs de factores quimiotácticos / quemoattractantes, como el factor derivado de células estromales tipo 1 (SDF-1, *Stromal Cell Derived Factor 1*) y la proteína quemoattractante de monocitos 1 α (MCP-1 α , *Monocyte Chemoattractant Protein 1 α*) para los cuales las CEMO presentan receptores específicos.

- c) Evaluar si las CEMO tienen la capacidad de restaurar el proceso de percepción sensorial, disminuir o hacer desaparecer el dolor de tipo neuropático que acompaña a las lesiones del nervio periférico, analizando el fenotipo comportamental de los animales frente a estímulos mecánicos (filamentos de von Frey) y térmicos fríos (acetona, test de Choi).

- d) Estudiar los cambios en el patrón de expresión de los neuropéptidos NPY y galanina, el receptor Y₁ de NPY, la enzima nNOS y la forma activa (fosforilada) del receptor

de alta afinidad del NGF, Trk_A, en las neuronas aferentes primarias luego de la injuria periférica y la administración de CEMO, con el fin de profundizar en el conocimiento de los posibles mecanismos involucrados en la acción de estas células.

- e) Comprobar si las CEMO son capaces de diferenciarse *in vivo* a neuronas o células satelitales en el ganglio raquídeo, mediante el estudio de la expresión de marcadores específicos de los distintos linajes. Caracterizar los marcadores propios de las CEMO *in vitro* e *in vivo* en animales a tiempos cortos post transplante, con el objeto de establecer su derivación a otros tipos celulares.

Proyecto 5: Efecto de la administración del ODN IMT504 a animales con una compresión mecánica aguda de su nervio ciático

Como se verá en el capítulo de Resultados, los datos obtenidos en el proyecto anterior fueron sumamente interesantes, ya que pudimos mostrar la participación activa de las CEMO en un modelo animal de dolor neuropático, con migración e implantación en los ganglios raquídeos lumbares afectados por la injuria periférica, prevención del desarrollo de alodinia mecánica y térmica y modificación de la expresión de diversas moléculas involucradas en la neurotransmisión nociceptiva.

De todas formas, y más allá de los inconvenientes e incógnitas que existen todavía con respecto a la aplicación de terapias celulares, el modelo anterior cuenta con algunas desventajas desde el punto de vista de su probable aplicación en terapéutica humana. Una de ellas es la vía de administración de las CEMO. Si bien la inyección intraganglionar nos permitió estudiar la acción de las CEMO en estrecha relación con las neuronas aferentes primarias, esta vía de administración no es posible en el contexto clínico. Por otra parte, la obtención de las CEMO por punción medular, su aislamiento y expansión *in vitro*, y su posterior administración al paciente, constituyen fases de moderada complejidad técnica, que dificultarían su aplicación masiva. Por estas razones, resultaría interesante poder activar y movilizar las CEMO endógenas del paciente, para que sean éstas las que participen en los procesos regenerativos.

Con el fin de lograr este objetivo recurrimos a la aplicación del ODN IMT504 que, como ya se adelantó en la Introducción, tiene la capacidad de estimular la

proliferación y la movilización de las CMM (Hernando Insúa et al., 2007). De hecho, en animales tratados con IMT504 en forma subcutánea durante 5 días consecutivos, se observa un incremento en el número de CFU-Fs, indicadoras del número de CMM presentes, tanto en la médula ósea como en sangre periférica a la semana de comenzado el tratamiento (Hernando Insúa et al., 2007).

Teniendo en cuenta estas propiedades del IMT504, nos propusimos evaluar si este ODN tiene algún efecto, ya sea *per se* o indirectamente mediante la estimulación de las CMM, en un modelo animal de dolor neuropático. Para ello estudiamos la conducta nociceptiva de animales sometidos a una compresión mecánica aguda de su nervio ciático, a los que se les administró IMT504 durante 5 días consecutivos. Para profundizar en los posibles mecanismos de acción de este ODN, evaluamos la migración de CMM endógenas hacia los sitios de injuria y la expresión de diferentes moléculas involucradas en la neurotransmisión nociceptiva.

Los objetivos específicos fueron:

- a) Analizar las respuestas frente a estímulos mecánicos y térmicos de animales sometidos a una lesión mecánica de su nervio ciático y tratados con IMT504, y compararlas con las de animales con el mismo tipo de lesión e inyección intravascular de CEMO, y los respectivos controles, inyectados con vehículo.
- b) Evaluar si el ODN IMT504 induce la migración y la implantación de CMM endógenas en los tejidos afectados por la injuria (nervio ciático, ganglios lumbares),

determinando la presencia de marcadores específicos de las CMM en dichos tejidos.

- c) Estudiar los niveles de expresión de los neuropéptidos NPY y galanina, el receptor Y_1 de NPY y la enzima nNOS en las neuronas aferentes primarias luego de la injuria periférica y la administración de IMT504.

Diseño experimental

Proyecto 1: Efecto de la inyección intraneural de colchicina sobre la expresión del NPY y su receptor Y₁ en las neuronas aferentes primarias

- Se utilizaron 86 ratas macho Sprague-Dawley.
- El nervio ciático fue sometido a una injuria tóxica inducida por la inyección intraneural de colchicina 5, 10 o 20 mM (n=6 para cada concentración de colchicina utilizada). También se evaluaron animales con inyección intraneural de solución fisiológica (SF) (n=4) y animales controles (sin ningún tipo de lesión ni procedimiento quirúrgico) (n=4). Todos estos animales fueron perfundidos luego de 7 días, con disección de los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales.
- Se estudió otro grupo de animales con administración intraneural de colchicina 10 mM (n=36) o SF (n=18). Se incluyeron también seis animales controles (sin ningún tipo de lesión ni procedimiento quirúrgico). Luego de diferentes tiempos (1, 3, 7, 14, 21 o 28 días), los animales fueron perfundidos y se disecaron los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales.
- Los ganglios fueron procesados para inmunohistoquímica convencional utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra NPY e Y₁.
- Las secciones se observaron en un microscopio óptico, las neuronas aferentes primarias NPY- e Y₁-IR fueron cuantificadas y se tomaron las correspondientes microfotografías.

Proyecto 2: Expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias de animales con diferentes grados de compresión de su nervio ciático

- Se evaluaron 100 ratas macho Sprague-Dawley.
- Los animales fueron sometidos a una lesión mecánica crónica de su nervio ciático mediante una ligadura única, ejerciendo diferentes grados de compresión del nervio. Se estudiaron animales con compresión suave (n=28), moderada (n=28) o intensa (n=28).
- Al grupo control se le colocó el hilo de sutura alrededor del ciático, sin inducir compresión del mismo (n=16).
- Luego de 7, 14, 30 o 60 días, los animales fueron perfundidos, se disecaron los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales y los correspondientes niveles de la médula espinal.
- Los tejidos fueron procesados para inmunohistoquímica convencional utilizando un anticuerpo dirigido contra el neuropéptido galanina.
- Se observaron las secciones de los ganglios y las médulas en un microscopio óptico, se cuantificaron las neuronas aferentes primarias galanina-IR, y se tomaron las correspondientes microfotografías.

Proyecto 3: Expresión de la enzima nNOS y producción de NO en los GARDs y la médula espinal de animales con axotomía de su nervio ciático

- Se estudiaron 110 ratas macho Sprague-Dawley.
- El modelo de lesión utilizado fue la axotomía del nervio ciático (n=70).
- Como controles, se estudiaron animales en los que se expuso el nervio sin inducir ningún tipo de lesión (n=40).
- Los animales lesionados (n=30) y controles (n=20) destinados a evaluar la expresión de la enzima nNOS se perfundieron luego de 7, 14, 28, 35 o 42 días. Se disecaron los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales y los correspondientes niveles de la médula espinal.
- Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica convencional utilizando un anticuerpo dirigido contra la enzima nNOS.
- Se observaron las secciones de los ganglios y las médulas en un microscopio óptico, se cuantificaron las neuronas aferentes primarias nNOS-IR y se tomaron las correspondientes microfotografías.
- Los animales lesionados (n=40) y controles (n=20) destinados a medir la producción de NO fueron decapitados luego de 7, 14, 28, 35 o 42 días. Se disecaron y homogeneizaron los ganglios L4-5 ipsi y contralaterales y las fracciones ipsi y contralaterales de la médula espinal lumbar.
- En los homogenatos se determinó la concentración de nitritos y nitratos utilizando un Analizador de NO (Sievers) y la concentración de proteínas mediante la técnica de Lowry.

Proyecto 4: Rol de las CEMO en modelos animales de dolor neuropático

- Se evaluaron 156 ratas macho Sprague-Dawley.
- El nervio ciático fue comprimido mediante una ligadura única, con reducción del 40-80% de su diámetro original (CUNP moderada).
- Las CEMO se aislaron a partir de una punción de médula ósea de tibia y fémur de ratas Sprague-Dawley, se cultivaron hasta sub-confluencia y fueron cosechadas y administradas a los animales mediante inyección i.g. en el GARD L4 derecho (3×10^5 células / 5 μ l de buffer fosfato salino, PBS) inmediatamente antes de realizar la compresión del nervio.

4.1. Migración de las CEMO a los ganglios raquídeos afectados por la injuria

- Previo a su administración, las CEMO fueron incubadas con el marcador fluorescente Hoechst a fin de poder detectarlas en los ganglios raquídeos luego de la perfusión de los animales.
- Se estudiaron tres grupos experimentales: con CUNP del nervio ciático ipsilateral (n=6), bilateral (n=6) o contralateral (n=6) al ganglio L4 en el que se inyectaron las CEMO. Todos estos animales se perfundieron luego de 9 días.
- Como controles se evaluaron animales con CUNP ipsilateral a la inyección i.g. (L4) de células mononucleares de linaje hematopoyético (CMN-H) perfundidos el día 9 post lesión (n=6), y animales con CUNP ipsilateral a la inyección i.g. (L4) de CEMO, sacrificados inmediatamente luego de la cirugía (n=4).

- Luego de la perfusión, se disecaron los ganglios raquídeos L3-6 y T10 ipsi y contralaterales. Los mismos fueron cortados en crióstato y las secciones observadas con un microscopio de fluorescencia para determinar la presencia de células Hoechst-positivas.

4.2. Expresión de factores quimiotácticos en los GARDs

- Se estudiaron animales con CUNP moderada e inyección i.g. de CEMO en el GARD L4 ipsilateral (n=4).
- Como controles se incluyeron animales con la lesión periférica únicamente (n=4), y animales con CUNP ipsilateral a la inyección i.g. de PBS (n=4).
- Luego de 7 días, los animales fueron perfundidos. Se disecaron los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales y se procesaron para inmunohistoquímica convencional utilizando anticuerpos dirigidos contra SDF-1 y MCP-1 α .
- Se observaron las secciones en un microscopio óptico, se cuantificaron las neuronas aferentes primarias inmunoreactivas para cada uno de los marcadores estudiados y se tomaron las correspondientes microfotografías.

4.3. Conducta nociceptiva de los animales con CUNP tratados con CEMO

- Se evaluaron animales con CUNP moderada e inyección de CEMO en el GARD L4 ipsilateral a la lesión (n=10).
- Como controles se estudiaron animales sometidos a la CUNP del nervio únicamente

(n=10), y animales con CUNP e inyección i.g. de CMN-H (n=10) o PBS (n=10) en el GARD L4 ipsilateral.

- Todos estos animales fueron evaluados en su conducta nociceptiva previo a la cirugía y 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 56 días después de realizada la misma, utilizando el test de von Frey y el test de Choi.

4.4. Efecto de las CEMO sobre la expresión de neuropéptidos, neuromoduladores gaseosos y factores neurotróficos

- Se estudiaron animales con CUNP moderada e inyección i.g. de CEMO en el GARD L4 ipsilateral (n=16).
- Como controles se incluyeron animales con la lesión periférica únicamente (n=16), y animales con CUNP ipsilateral a la inyección i.g. de CMN-H (n=16) o PBS (n=16).
- Luego de 7 días, los animales destinados a protocolos de inmunomarcación fueron perfundidos. Se disecaron los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales y se procesaron para inmunohistoquímica convencional, incubando las secciones con anticuerpos dirigidos contra NPY, Y₁, galanina y nNOS.
- Se observaron las secciones en un microscopio óptico, se cuantificaron las neuronas aferentes primarias inmunoreactivas para cada uno de los marcadores estudiados y se tomaron las correspondientes microfotografías.
- Los animales destinados a la determinación electroforética de proteínas fueron decapitados luego de 7 días. Los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales fueron disecados, homogeneizados y procesados por Western Blot, utilizando anticuerpos específicos para la enzima nNOS y el receptor Trk_A fosforilado.

- Se escanearon las membranas de nitrocelulosa y se procedió a la cuantificación de la densidad óptica de cada banda detectada, utilizando un analizador de imágenes.

4.5. Diferenciación de las CEMO a fenotipos neurales

- Se estudiaron animales con CUNP moderada e inyección i.g. de CEMO marcadas con Hoechst en el GARD L4 ipsilateral (n=12).
- Luego de 7, 14 y 21 días, los animales fueron perfundidos. Las secciones de los GARDs L4-5 ipsi y contralaterales se procesaron para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores neuronales y gliales como nestin, NeuN, neurofilamento M, β -III-tubulina y GFAP. También se evaluó la expresión de marcadores de CMM (STRO-1, CD73, CD49 α).
- Se observaron las secciones con un microscopio de fluorescencia en busca de células Hoechst-positivas que expresaran los marcadores citados.
- Para conocer el fenotipo original de las CEMO, se evaluó mediante inmunocitoquímica la expresión de todos los marcadores citados en las células en cultivo.

Proyecto 5: Efecto de la administración del ODN IMT504 a animales con una compresión mecánica aguda de su nervio ciático

- Se estudiaron 72 ratas macho Sprague-Dawley.
- El nervio ciático fue comprimido durante 3 segundos utilizando una pinza de relojero y produciendo una compresión mecánica aguda (CMA).
- Los animales (n=8) fueron inyectados en forma subcutánea con 500 µl de una solución del ODN IMT504 (20 mg/kg/dosis disueltos en SF estéril). Se aplicaron 5 dosis, la primera inmediatamente después de realizada la lesión, y las restantes, una por día durante los 4 días consecutivos.
- A fin de comparar la actividad del ODN con la de las CEMO, se incluyeron animales (n=8) con CMA e inyección de una suspensión de CEMO (2×10^6 células / 500 µl de PBS) en la vena de la cola (una única inyección inmediatamente después de realizar la CMA).
- Como controles se estudiaron animales con CMA e inyección subcutánea de SF (5 administraciones durante 5 días consecutivos), o una única inyección intravascular de PBS. Se incluyeron 8 animales en cada uno de estos grupos controles.

5.1. Conducta nociceptiva

- Los animales pertenecientes a los cuatro grupos en estudio fueron evaluados en su conducta nociceptiva previo a la cirugía y 1, 3, 7, 10, 14 y 21 días después de realizada la misma, utilizando el test de von Frey y el test de Choi.

5.2. Efecto del IMT504 sobre la migración de CMM endógenas y la expresión de neuropéptidos y neuromoduladores

- Luego de diferentes tiempos (3, 7, 14 y 21 días), los animales experimentales (con CMA y administración de IMT504, n=24) y controles (con CMA e inyección de SF, n=16) fueron perfundidos y se disecaron los nervios y los ganglios L4-5 ipsi y contralaterales. Los tejidos fueron cortados en crióstato y las secciones procesadas para inmunomarcación.
- Mediante inmunofluorescencia se evaluó la migración de CMM endógenas hacia los ganglios lumbares y los nervios ciáticos, utilizando anticuerpos dirigidos contra moléculas marcadoras de CMM (CD49 α , CD73, STRO-1).
- Mediante inmunohistoquímica de cortes de ganglios, se estudió la expresión de los neuropéptidos NPY y galanina, del receptor Y₁ de NPY, y de la enzima nNOS.
- Se observaron las secciones en un microscopio óptico, se cuantificaron las neuronas aferentes primarias inmunoreactivas para cada uno de los marcadores estudiados y se tomaron las correspondientes microfotografías.

Materiales y Métodos

1) **Animales de experimentación** (Proyectos 1-5)

Todos los experimentos fueron conducidos siguiendo las indicaciones de la IASP y la Sociedad de Neurociencias (SFN, *Society for Neuroscience*) para el uso de animales en investigaciones del sistema nervioso y modelos de dolor, y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (Resolución #24/03).

Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley de 200-300 g de peso (Fucal, Buenos Aires, Argentina). Los animales fueron mantenidos en un ciclo día/noche de 12 horas, con acceso *ad libitum* a comida y agua, y con temperatura ambiental controlada (24°C).

2) **Modelos de lesión** (Proyectos 1-5)

Se utilizaron varios modelos de lesión neural periférica que se acompañan de dolor neuropático, siempre aplicados al nervio ciático, desde una injuria tóxica de nervio por inyección intraneural de colchicina (Aquino et al., 2006), hasta lesiones mecánicas de diferente tipo comprendiendo desde la clásica axotomía (Villar et al., 1989, Villar et al., 1991), un modelo desarrollado en nuestro laboratorio de compresiones graduables mediante ligadura única permanente (Brumovsky y col., 2004) y la compresión mecánica y aguda del nervio (“crush”) (Aquino et al., 2006). En todos los casos, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (350 mg/kg, i.p.) antes realizar la intervención quirúrgica.

2.1) Inyección intraneural de colchicina (Proyecto 1): El nervio ciático se expuso a nivel medio del muslo y fue liberado del tejido conectivo circundante con la ayuda de pinzas finas y microtijeras. Se procedió a la inyección de 2 μ l de una solución de colchicina (5, 10 o 20 mM en SF estéril, Sigma, Missouri, USA) utilizando una jeringa Hamilton de 10 μ l (1801RN, Hamilton Company, Nevada, USA) montada sobre un marco estereotáxico. La inyección fue realizada en un punto 5 mm distal al nacimiento de la rama *cutaneus femoris caudalis*, con la aguja orientada hacia la periferia. Para identificar el sitio de la inyección, se realizó una sutura en el músculo cercano. Los animales controles fueron inyectados con 2 μ l de SF estéril (Productos Farmacéuticos Fidex S.A., Argentina).

2.2) Compresión única del nervio periférico (Proyectos 2 y 4): El nervio ciático fue expuesto a nivel medio del muslo y su diámetro reducido en grado variable mediante una ligadura permanente. Para ello, se colocó una lámina delgada de polietileno (5x5 mm) alrededor del nervio y se procedió a su compresión, usando hilo de sutura de seda (3.0) (Barbour Threads, Lisburn, Ireland). Se realizaron compresiones ‘suaves’ (con reducción del 10-30% del diámetro original del nervio), ‘moderadas’ (reducción del 40-80%) e ‘intensas’ (reducción \geq al 90% del diámetro del nervio). Además, en algunos animales utilizados como control, se agregó la lámina de polietileno y el hilo de sutura de seda alrededor del nervio ciático, sin inducir compresión del mismo. Las compresiones se realizaron con la ayuda de un microscopio de disección (magnificación 40x, S5, Carl Zeiss, Alemania), y el grado de compresión para cada nervio fue certificado luego de la fijación del animal de dos maneras: mediante observación del nervio comprimido usando una lupa

de disección, con la ayuda de una regla milimetrada, y por observación microscópica de secciones del nervio teñidas con rojo neutro, utilizando una grilla adosada al ocular del microscopio.

2.3) Axotomía (Proyecto 3): El nervio fue expuesto a la altura media del muslo y seccionado en forma distal a una ligadura intensa. Dicha ligadura se realizó con hilo de sutura de seda (3.0, Barbour Threads). Posteriormente, se extrajeron los primeros 5 mm del segmento distal a la sección del nervio, con el objeto de evitar la re-unión del nervio seccionado.

2.4) Compresión mecánica aguda (Proyecto 5): El nervio ciático fue expuesto como se describe en los puntos anteriores, y comprimido durante 3 segundos utilizando una pinza de relojero, con intensidad media. Para identificar el sitio de la inyección, se realizó una sutura en el músculo cercano.

3) Aislamiento, cultivo, cosecha y administración de CEMO (Proyectos 4 y 5)

3.1) Aislamiento y cultivo de CEMO y CMN-H: Se utilizó el protocolo de aislamiento descrito por Azizi y col. (Azizi et al., 1998), tal como se describe brevemente a continuación. Las muestras de médula ósea (Figs. 8a,b) se obtuvieron mediante punción de tibia y fémur de ratas macho Sprague-Dawley (200-250 g), utilizando una jeringa de 3 ml con aguja 15 G y 3 ml de medio de cultivo DMEM (GIBCO, Maryland, USA). Estas muestras fueron incubadas durante 10 minutos con solución buffereada de cloruro de amonio 0.15 M, con el objeto de lisar los glóbulos rojos. Luego de realizar dos

lavados con PBS 0.05M (centrifugación a 250 x g por 10 minutos), las CMN fueron aisladas utilizando un gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque Plus, 1.077 g/ml, Pharmacia Biotech), mediante centrifugación a 400 x g durante 30 min. Posteriormente, las CMN fueron lavadas con PBS y plaqueadas en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning Inc., New York, USA) a una concentración de 1 x 10⁶ células / ml en DMEM con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL), 50 µg/ml de gentamicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B (Laboratorios Richet S.A., Argentina), e incubadas en estufa (Forma Scientific Inc., USA) a 37°C y 5% de CO₂ (Praxair Intl., Illionis, USA). Luego de 48 hs en cultivo, las células no adherentes (CMH, progenitores hematopoyéticos y células diferenciadas de linaje hematopoyético que en adelante se agruparán bajo la denominación CMN-H) fueron cosechadas realizando un cambio de medio. Las mismas se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo durante 24 hs a fin de marcarlas mediante incubación con el reactivo de Hoechst (se explica a continuación) y se utilizaron en algunos experimentos como fracción celular control. Por su parte, las CEMO adheridas a la placa fueron lavadas con PBS y mantenidas en cultivo hasta el día 14 (Figs. 8c,d), realizando cambios del medio cada 3 días.

3.2) Marcación de CEMO, CMN-H y preparación de inóculos: Previo a la cosecha, las CEMO fueron incubadas con el marcador fluorescente nuclear bis-benzamida (Hoechst 33258, 1 µg/ml, Sigma) durante 24 hs a 37°C (Lee et al., 2003) (Figs. 8e-h). Este fluoróforo tiene la virtud de quedar retenido en las células vivas por largos períodos que alcanzan los dos meses y no ser transferido a las células contiguas. Las CEMO fueron cosechadas utilizando tripsina 0.05% - EDTA 0.02 mM (GIBCO) y resuspendidas en PBS

estéril a una concentración de 2×10^6 células / 500 μ l (para inyección intravascular) y 3×10^5 células / 5 μ l (inyección i.g.). La viabilidad celular fue evaluada utilizando el test de exclusión del colorante Azul Tripán (Phillips, 1973). Las CMN-H utilizadas como fracción celular control también fueron marcadas por incubación con Hoechst y resuspendidas en PBS a las mismas concentraciones que las CEMO.

3.3) Transplante de CEMO y CMN-H: Las células marcadas con Hoechst fueron transplantadas a los diferentes grupos de animales por dos vías:

(a) *Intraganglionar (Proyecto 4):* La inyección se realizó en el ganglio raquídeo lumbar 4 (L4) de animales a los que se sometió simultáneamente a una CUNP moderada.

(b) *Intravascular (Proyecto 5):* La inyección intravascular fue realizada en la vena de la cola de animales sometidos a una CMA de su nervio ciático.

4) Oligonucleótido IMT504 (Proyecto 5)

El IMT504, propiedad de Immunotech S.A., es un ODN simple cadena, con la secuencia 5'-TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATT-3' (Oligos ETC, Bethel, Maine, USA). El ODN calidad HPLC fue resuspendido en SF estéril (10 mg/ml) para su administración a los animales con CMA de su nervio ciático. Se aplicaron 5 dosis (20 mg/kg/dosis) en forma subcutánea, la primera inmediatamente después de realizada la lesión, y las restantes, una por día durante los 4 días consecutivos.

5) Conducta nociceptiva (Proyectos 4 y 5)

5.1) Test de von Frey: Los tests de conducta fueron realizados durante la mañana (10.00-13.00 hs) en una habitación aislada. Los animales fueron ubicados en cajas de acrílico transparente (8×8×18 cm) apoyadas sobre una malla metálica (tamaño del orificio, 3×3 mm), colocada a su vez sobre una caja de madera (Fig. 9a). Luego de 15 minutos de adaptación, una serie de filamentos de von Frey (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 26 gramos fuerza) (Stoelting, WoodDale, Illinois, USA) fueron aplicados secuencialmente, de manera ascendente, hacia el centro de la superficie plantar de la patas traseras del animal (Figs. 9b,c) (Chaplan et al., 1994), con el fin de evaluar la respuesta de los animales frente a estímulos mecánicos. Cada filamento fue aplicado tres veces con intervalos de aproximadamente 5s. Se consideró que el estímulo desencadenaba una respuesta dolorosa, si el animal retiraba bruscamente su pata, la lamía o, incluso, vocalizaba. Se determinó el umbral de dolor en base al menor gramaje que indujera una respuesta positiva en al menos dos de las tres estimulaciones aplicadas. Se consideró umbral de respuesta en rango alodínico a aquel obtenido con filamentos de 6 gramos fuerza o menos.

5.2) Test de Choi: Para la determinación de alodinia al frío se procedió según el método de Choi (Choi et al., 1994) en los mismos horarios y utilizando las mismas jaulas que en el test de von Frey (Fig. 9a). En este caso, se estimuló la superficie plantar de las patas traseras del animal con una gota de acetona, formada en la punta de un tubo de polietileno conectado a una jeringa. Dicho estímulo se repitió 5 veces, con intervalos de 5 min, en cada pata. La retirada brusca de la pata se expresó como un punto, siendo la

frecuencia de retirada máxima, 5, y la mínima, 0.

6) Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e inmunocitoquímica (Proyectos 1-5)

6.1) Perfusión de los animales y preparación de los tejidos: Luego de diferentes tiempos de producida la lesión, los animales destinados a técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia fueron sobrealterados con hidrato de cloral (1.5 g/kg, i.p.) y perfundidos por vía transcardíaca con 60 ml de buffer Tyrode (pH 7.4) a 37°C, seguidos por 60 ml de una mezcla de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0.2%, diluídos en buffer fosfato 0.16 M (pH 7) (Zamboni and De Martino, 1967) (Pease, 1962) a 37°C, y finalmente, 300 ml del mismo fijador a 4°C. Los nervios ciáticos y ganglios L3-L6 ipsi- y contralaterales, así como la médula espinal lumbar, fueron rápidamente disecados e inmersos en el mismo fijador por 90 min a 4°C. Luego, los tejidos fueron sumergidos en sacarosa al 20% diluída en PBS 0.2 M (pH 7.2) conteniendo 0.01% de azida sódica (Sigma) por 24 hs.

6.2) Inmunohistoquímica: Se obtuvieron secciones de 14 µm de espesor de los distintos tejidos previamente embebidos en el medio de montaje para criosecciones (Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA) utilizando un crióstato (Microm, Heidelberg, Germany).

Las secciones, montadas en portaobjetos gelatinizados con una mezcla conteniendo gelatina y aluminio de cromo, fueron procesadas usando el protocolo del complejo avidina-

biotina (Hsu et al., 1981). Los cortes fueron secados durante 90 min a temperatura ambiente, lavados con PBS y deshidratados con soluciones de concentración creciente de alcohol. Luego se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena, mediante exposición de los cortes a peróxido de hidrógeno diluído en etanol (0.005 %).

Luego de re-hidratar y lavar con PBS, las secciones se incubaron en cámara húmeda a 4°C por 24 hs, con los diferentes anticuerpos primarios dirigidos contra: NPY (1:4000, conejo, Peninsula Laboratories, California, USA), Y₁ (1:8.000, conejo, provisto por el Dr. T. Hökfelt,) (Zhang et al., 1994a), galanina (1:3000, conejo, Peninsula Laboratories), nNOS (1:4000, cabra, Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA), SDF-1 (1:4000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), MCP-1 α (1:4000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), β -III-tubulina (1:3000, ratón, Chemicon International Inc.). Todos estos anticuerpos fueron diluídos en PBS conteniendo 0.2% de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma), 0.03% de Tritón X-100 (Sigma) y 0.1% de azida sódica (Biopack, Argentina).

Posteriormente, las secciones se lavaron dos veces con PBS y se incubaron por 60 min a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios biotinilados (1:100, Vector Laboratories, California, USA), dirigidos contra la especie que originó el anticuerpo primario. Luego de otros dos lavados con PBS, los cortes se incubaron con los reactivos del complejo avidina-biotina-peroxidasa, del kit "Elite" de Vector (Vector Laboratories) durante 1 h y a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa fue demostrada por reacción con peróxido de hidrógeno, usando el protocolo de diaminobenzidina

intensificada por níquel, con incremento de la señal inmunoreactiva. Luego de deshidratar las secciones, se cubrieron con cubreobjetos, usando Permount (Fisher Scientific Company, New Jersey, USA) como medio de montaje.

Como control de la técnica de inmunohistoquímica, se incubaron algunas secciones omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios. Además, se realizaron incubaciones paralelas de secciones con los antisueros contra NPY, Y₁ y galanina (usando las mismas diluciones indicadas anteriormente) prebloqueados con los correspondientes péptidos inmunogénicos (NPY y galanina, Peninsula Laboratories; Y₁ donación del Dr T. Hökfelt) a una concentración de 10⁻⁶ M.

6.3) Inmunofluorescencia: También en este caso se trabajó sobre secciones de 14 µm de espesor de los distintos tejidos. Las secciones, montadas en portaobjetos gelatinizados, fueron lavadas con PBS, deslipidizadas por tratamiento con soluciones alcohólicas de concentración creciente y rehidratadas utilizando las mismas soluciones en orden de concentración decreciente.

Luego de dos lavados con PBS, las secciones fueron incubadas en cámara húmeda a 4°C por 24 hs con los diferentes anticuerpos primarios dirigidos contra: STRO-1 (1:2.500, ratón, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA), CD49α ó Integrina α1 (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), CD73 (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), Nestin (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), NeuN (1:2000, ratón, Chemicon International Inc.), Neurofilamento M (1:1000, conejo, Santa

Cruz Biotechnology Inc.), β -III-tubulina (1:1000, ratón, Chemicon International Inc.), GFAP (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Todos estos anticuerpos fueron diluídos en PBS conteniendo 0.2% de BSA, 0.03% de Tritón X-100 y 0.1% de azida sódica.

Posteriormente, las secciones se lavaron dos veces con PBS y se incubaron por 30 min a 37°C con anticuerpos secundarios marcados con iso-tio-cianato de fluoresceína (FITC) o rodamina (1:100, Vector Laboratories) dirigidos contra la especie que originó el anticuerpo primario. Luego, las secciones fueron lavadas con PBS y cubiertas con cubreobjetos usando 1,4-diaza-biciclo-octano (DABCO) al 2.5% como medio de montaje (Sigma).

Como control de la técnica de inmunofluorescencia, se procesaron algunas secciones siguiendo el protocolo descrito en párrafos anteriores, pero omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios.

6.4) Inmunocitoquímica: Con el fin de analizar la expresión de diferentes marcadores en las CEMO en cultivo, se realizó inmunocitoquímica de las células en subconfluencia, directamente sobre la placa de cultivo.

Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de realizar dos lavados con PBS, se procedió a la permeabilización de las células incubándolas durante 15 min con Tritón al 1% en PBS.

Seguidamente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos mediante incubación por 15 min con BSA al 1% en PBS.

Las placas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios diluídos en PBS-Tritón-BSA durante 24 hs a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron: STRO-1 (1:2.500, ratón, Developmental Studies Hybridoma Bank), Integrina $\alpha 1$ o CD49 α (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), CD73 (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), Nestin (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), NeuN (1:2000, ratón, Chemicon International Inc.), Neurofilamento M (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.), β -III-tubulina (1:1000, ratón, Chemicon International Inc.), GFAP (1:1000, conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Posteriormente, las placas fueron lavadas con PBS, e incubadas durante 60 min con los anticuerpos secundarios marcados con FITC o rodamina (1:100, Vector Laboratories) y dirigidos contra la especie que originó el anticuerpo primario. Luego de lavar nuevamente con PBS, las placas fueron cubiertas con cubreobjetos, utilizando DABCO 2.5% como medio de montaje.

7) Microscopía y cuantificación (Proyectos 1-5)

7.1) Microscopía e imágenes (Proyectos 1-5): Todas las secciones fueron examinadas con un fotomicroscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japan) dotado con iluminación de campo claro y fluorescencia. Las fotografías se tomaron usando una cámara

fotográfica adosada al microscopio usando film Technical Pan (Eastman Kodak, New York, USA) (Proyectos 1, 2 y 3), o una cámara digital Nikon DXM 1200 (Proyectos 4 y 5). La resolución, el brillo y el contraste de las imágenes digitales fueron optimizados utilizando el programa “Adobe Photoshop” (Adobe Systems Inc., California, USA).

7.2) Cuantificación (Proyectos 1-5): Se contaron los perfiles neuronales inmunoreactivos para NPY, Y₁, galanina y nNOS en secciones de ganglios raquídeos lumbares usando un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E800) dotado de un objetivo de 20 x (magnificación total de 200 x). Las secciones en las que se realizó el conteo fueron tomadas al azar en forma sistemática a lo largo de toda la extensión de cada ganglio (cada 6^{ta} sección, con un total de 10 secciones por ganglio).

7.3) Expresión de resultados (Proyectos 1-3): El número de neuronas inmunoreactivas para NPY, Y₁, galanina y nNOS, se relacionó con el número total de neuronas presentes y se expresó como porcentaje. Para ello, se cuantificaron primero las neuronas inmunoreactivas, y en una segunda etapa, las secciones fueron contracoloradas con violeta de cresilo de modo de poder realizar la cuantificación del número total de neuronas presentes en cada sección. En ambos casos, sólo los perfiles neuronales con núcleo visible fueron contados. En el caso de galanina (Proyecto 2), se realizó una cuantificación diferencial, clasificando a las neuronas galanina-IR en dos grupos según su tamaño: neuronas pequeñas y neuronas medianas y grandes. Para ello, se adosó al ocular del microscopio una grilla (30x30 µm). Los perfiles neuronales galanina-IR de diámetro menor a 30 µm fueron incluidos en el grupo de neuronas pequeño tamaño; por el contrario,

células de diámetro mayor a 30 μm , fueron consideradas medianas-grandes.

7.4) Expresión de resultados (Proyecto 4): El número total de perfiles neuronales positivos para NPY, galanina, Y_1 y nNOS fue 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 un equipo KS400 de Kontron Elektronik (Zeiss, Alemania) acoplado a una cámara de video color (3CCD, DXC-950, Sony Corp., Japón) conectado a un microscopio Optiphot-2 (Nikon). La cuantificación computarizada fue realizada usando el programa “NIH Image” de dominio público. De este modo, se determinó el número de perfiles neuronales inmunoreactivos por cada 100.000 micrómetros cuadrados de área.

8) Determinación de nitritos y nitratos (Proyecto 3)

8.1) Preparación de homogenatos: Luego de 7, 14, 28, 35 o 42 días de producida la axotomía del ciático, los animales fueron anestesiados y sacrificados por decapitación. Los GARDs L4-5 ipsi- y contralaterales y la médula espinal lumbar se disecaron y lavaron en SF estéril. Cada segmento de la médula espinal se seccionó en dos porciones: derecha (ipsilateral) e izquierda (contralateral), con la ayuda de un microscopio de disección (magnificación 20 x, S5, Carl Zeiss). Los tejidos se homogeneizaron y centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. Se utilizó un buffer de homogeneización (pH 7.4) compuesto por Tris-ClH 20 mM, sacarosa 0.32 M, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, conteniendo

inhibidores de proteasas al 10% (Protease Inhibitor Cocktail). Todos estos reactivos fueron provistos por Sigma. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry, y la concentración de nitritos y nitratos mediante una reacción de quimioluminiscencia.

8.2) Determinación de nitritos y nitratos: La producción de NO fue evaluada mediante la determinación de sus productos de oxidación estables, nitritos y nitratos (óxidos de nitrógeno, NO_x), utilizando un Analizador de NO (NOA 280, Sievers Instruments Inc., USA). Los NO_x presentes en las muestras fueron reducidos a NO por reacción con cloruro de vanadio (solución sobresaturada) en HCl a 90°C (Braman and Hendrix, 1989). El NO producido reaccionó con ozono (Praxair Intl.) generando dióxido de nitrógeno, producto quimioluminiscente cuyas emisiones en la zona roja e infrarroja del espectro fueron detectadas por un tubo fotomultiplicador. El analizador fue calibrado utilizando soluciones de nitrato de sodio (Sigma) 1-100 µM. La concentración de NO_x en las muestras se expresó como nmoles de NO_x / mg de proteína.

9) Western Blot (Proyecto 4)

9.1) Preparación de homogenatos: Los animales fueron anestesiados y sacrificados por decapitación. Los GARDs L4-5 ipsi- y contralaterales fueron disecados, lavados en SF estéril y homogeneizados en un buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas al 10% (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Las muestras se centrifugaron a 14.000 x g durante 15 min a 4°C. En el sobrenadante se determinó la concentración de

proteínas utilizando el método de Bradford, y la presencia de la enzima nNOS y del receptor Trk_A fosforilado, mediante Western Blot.

9.2) Western Blot: Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las condiciones de corrida (Mini Protean II, BioRad, USA) fueron las siguientes: gel concentrador al 4%, gel separador al 7.5%, 1 hora a temperatura ambiente y 150 voltios (Fuente de poder Power Pac 300, BioRad). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Life Science, USA), mediante pasaje de corriente eléctrica (100 voltios) durante 2 horas a 4°C (Mini Trans-Blot Cell, BioRad).

Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con solución de bloqueo (leche descremada Molico al 5 % y Tween 20 al 0.1% en PBS), y luego con los anticuerpos primarios correspondientes diluídos en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti nNOS (1:1000, cabra, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anti Trk_A fosforilado (1:250, conejo, Sigma). Luego de 3 lavados con PBS-Tween al 0.1%, las membranas se incubaron durante 1 hora con los correspondientes anticuerpos secundarios biotinilados (1:1500, Sigma).

Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween, incubadas durante 1 hora con estreptavidina-fosfatasa (1:10.000, Sigma), lavadas nuevamente y finalmente incubadas con los sustratos de la enzima, nitroblue tetrazolium y la sal de toluidina del 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, hasta la aparición de bandas violáceas. Se utilizó un

marcador de peso molecular (Molecular Probes, USA) a fin de determinar el peso molecular aproximado de las proteínas detectadas. Las membranas fueron digitalizadas y analizadas con un procesador de imágenes (Sigma Gel) para cuantificar la densidad óptica de cada banda.

10) Determinación de proteínas (Proyectos 3 y 4)

10.1) Método de Lowry (Proyecto 3): Se utilizó el método descrito por Lowry (Lowry et al., 1951), como se describe brevemente a continuación. Una alícuota de cada muestra se trató con NaOH 0.5 N y luego se incubó con una solución conteniendo carbonato de sodio al 2%, sulfato de cobre al 0.1% y tartrato de sodio-potasio al 0.2%. Se agregó luego el reactivo de Folin-Ciocalteau (Merck, Alemania), y después de 60 min de incubación, se midió la absorbancia de las muestras a 650 nm. La curva de calibración se preparó utilizando BSA.

10.2) Método de Bradford (Proyecto 4): Se utilizó el método descrito por Bradford (Bradford, 1976, Kruger, 1994), como se describe brevemente a continuación. Una alícuota de cada muestra se incubó con el reactivo homónimo (Sigma) durante 10 min y luego se midió su absorbancia a 595 nm. La curva de calibración se realizó utilizando BSA.

11) Análisis estadístico de los resultados (Proyectos 1-5)

El análisis estadístico del número de perfiles neuronales inmunoreactivos para los distintos marcadores evaluados (expresado ya sea como porcentaje del total de células o como número de neuronas por unidad de área), del umbral de respuesta detectado al estimular los animales con los filamentos de von Frey (expresado en gramos fuerza) y del número de respuestas dolorosas observadas al realizar la estimulación con acetona del Test de Choi (expresado como número de respuestas positivas), permitió determinar el valor mínimo y máximo para cada grupo, calcular la media, el error estándar de la media (SEM) y el intervalo de confianza del 95%. En todos los casos, los resultados se presentaron como la media \pm SEM.

A cada grupo se aplicó también el Test de Normalidad, para verificar la distribución normal de las variables continuas, y según los casos se aplicó el Análisis de la Varianza (ANOVA) de una o dos vías, de modo de determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en comparación. A posteriori se realizaron los Tests de Tukey o Newman Keuls, que permitieron definir entre cuáles de los grupos en estudio existían diferencias estadísticamente significativas. El grado de significancia estadística se representó de la siguiente manera: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Todos los procesamientos estadísticos fueron realizados utilizando programas apropiados como el “GraphPad Prism” (GraphPad Software; www.graphpad.com) y el “Stata” (Stata Corporation LP; www.stata.com).

Resultados

Proyecto 1: Efecto de la inyección intraneural de colchicina sobre la expresión del NPY y su receptor Y_1 en las neuronas aferentes primarias

1.1. La inyección intraneural de colchicina induce un aumento en la expresión del NPY y una disminución en la expresión de su receptor Y_1 en las neuronas aferentes primarias

En los ganglios contralaterales de animales con inyección intraneural de colchicina, así como en los ganglios lumbares de animales controles (sin ningún tipo de lesión ni procedimiento quirúrgico) se detectó la presencia de escasas neuronas medianas y grandes NPY-IR (Figs. 1.3a y 1.4a). La inyección intraneural de SF no produjo modificaciones en la expresión del neuropéptido en los GARDs ipsilaterales (Figs. 1.1a y 1.3a). Por el contrario, la administración de colchicina indujo un importante incremento, no sólo en el número de neuronas NPY-IR, sino también en la intensidad de la señal, en los ganglios lumbares ipsilaterales (Figs. 1.1b-f; 1.3a; 1.4b-h y 1.6a). Independientemente de la concentración de la solución de colchicina administrada y del tiempo post lesión evaluado, la inmunomarcación se detectó en el soma de neuronas de mediano y gran tamaño, con tinción citoplasmática de aspecto granular y neuronas intensamente teñidas (Figs. 1.1b-f y 1.4b-h). También se observaron numerosos procesos neuronales NPY-IR (Figs. 1.1d,f y 1.4f,h), así como algunos vasos sanguíneos rodeados de fibras nerviosas inmunoreactivas, de probable origen simpático.

En los ganglios lumbares de animales controles (sin ningún tipo de lesión ni procedimiento quirúrgico) se detectó inmunoreactividad para el receptor Y_1 en

alrededor del 20% de las neuronas aferentes primarias (Figs. 1.3b y 1.5a). La señal inmunoreactiva se encontró asociada a la membrana plasmática de neuronas de pequeño tamaño (Fig. 1.5a). El mismo patrón de inmunomarcación se observó en los ganglios ipsilaterales de animales con inyección intraneural de SF (Figs. 1.2a y 1.3b), y en los ganglios contralaterales de animales con inyección intraneural de colchicina. Por el contrario, en los ganglios ipsilaterales a la inyección de colchicina se observó una marcada disminución en el número de neuronas Y_1 -IR (Figs. 1.2b-d; 1.3b; 1.5b-h y 1.6b).

Los patrones de inmunomarcación descritos en los párrafos anteriores no se observaron en secciones utilizadas como control de la técnica de inmunohistoquímica, obtenidas por incubación con los anticuerpos dirigidos contra NPY e Y_1 pre-adsorbidos con los correspondientes péptidos inmunogénicos, o por omisión de los anticuerpos primarios o secundarios (resultados no mostrados).

1.2. La magnitud del cambio en la expresión de NPY e Y_1 depende de la concentración de la solución de colchicina inyectada

Como ya se mencionó, la inyección intraneural de colchicina indujo un importante incremento en la inmunoreactividad del NPY y una disminución correlativa en la expresión de su receptor Y_1 en los ganglios lumbares ipsilaterales. Soluciones de concentración creciente de colchicina (5, 10, 20 mM) indujeron un incremento progresivo en el número de neuronas NPY-IR (Figs. 1.1b,c,e y 1.3a), así como una progresiva disminución en el número de perfiles neuronales Y_1 -IR (Figs. 1.2b-d y 1.3b). La inyección intraneural de SF no modificó la inmunoreactividad del neuropéptido (Figs. 1.1a y 1.3a) y su

receptor (Figs. 1.2a y 1.3b), que mantuvieron niveles de expresión similares a los observados en animales controles (sin lesión) (Figs. 1.3a,b).

1.3. Evolución temporal de la expresión del NPY y su receptor Y_1 en las neuronas aferentes primarias luego de la inyección intraneural de colchicina

La injuria tóxica del nervio ciático resultó en un aumento progresivo en la expresión del NPY, observándose un leve incremento en el número de neuronas NPY-IR a partir del día 3, con el mayor número de neuronas positivas detectadas el día 14, y una posterior disminución de los niveles de expresión a partir del día 21, indicando la tendencia hacia la recuperación de los valores observados en animales controles (Figs. 1.4b-h y 1.6a). Como se señaló anteriormente, la administración de SF no indujo ninguna modificación en la expresión del neuropéptido, al compararla con la observada en los ganglios de animales controles.

La curva de los niveles de expresión del receptor Y_1 en función del tiempo mostró un perfil inverso al del NPY: el número de neuronas Y_1 -IR disminuyó significativamente el día 1 post lesión, los menores niveles de expresión del receptor se detectaron los días 3 y 7, y a partir del día 14 se observó un incremento progresivo en el número de perfiles neuronales Y_1 -IR (Figs. 1.5b-h y 1.6b). Al igual que para el NPY, la administración de SF no indujo ninguna modificación en la expresión del receptor Y_1 , al compararla con la observada en los ganglios de animales controles.

Proyecto 2: Expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias de animales con diferentes grados de compresión de su nervio ciático

2.1. La compresión del nervio ciático induce un aumento en la expresión de galanina

Tanto en los ganglios contralaterales de animales con cualquiera de los tres grados de compresión del nervio ciático, como en los ganglios de animales controles, sólo un bajo porcentaje de neuronas de pequeño tamaño ($2.3 \pm 0.3\%$) presentó inmunoreactividad para galanina (Figs. 2.1a,b; 2.2a,b; 2.3a,b y 2.4a,b). Luego de producida la compresión crónica del nervio mediante una ligadura única, se observó un aumento significativo en el número de neuronas galanina-IR en los ganglios raquídeos ipsilaterales a la lesión (Figs. 2.1c-e; 2.2a,b; 2.3c-e y 2.4a,b).

En el asta dorsal de la médula espinal de animales controles (a los que se les colocó una ligadura laxa alrededor del nervio ciático sin ejercer compresión), así como en el asta contralateral de animales con CUNP (Figs. 2.6b,d,f), se observaron terminales nerviosos inmunoreactivos para galanina en las láminas superficiales I y II. La ligadura del nervio ciático indujo un incremento significativo en la inmunoreactividad para galanina en el asta dorsal ipsilateral a la lesión (Figs. 2.6a,c,e), fundamentalmente en las láminas I y II.

Los patrones de inmunomarcación descritos en los párrafos anteriores no se observaron en secciones utilizadas como control de la técnica de inmunohistoquímica, obtenidas por incubación con el anticuerpo dirigido contra galanina pre-adsorbido con el

péptido inmunogénico, o por omisión del anticuerpo primario o secundario (resultados no mostrados).

2.2. La magnitud del incremento en la expresión de galanina se relaciona en forma directa con el grado de compresión del nervio ciático

En animales con CUNP suave se observó un moderado aumento en el número de neuronas galanina-IR en los GARDs ipsilaterales (Figs. 2.1c y 2.3c). De este modo, el $12.8\pm 1.4\%$ y el $13.1\pm 1.7\%$ de las neuronas aferentes primarias mostró inmunoreactividad para galanina a los 7 y 14 días de producida la lesión, respectivamente (Fig. 2.5a). En animales con CUNP moderada (Figs. 2.1d y 2.3d) o intensa (Figs. 2.1e y 2.3e), el incremento detectado fue aún mayor: luego de una compresión moderada el porcentaje de neuronas galanina-IR fue $46.5\pm 2.4\%$ y $56.3\pm 2.4\%$ a los 7 y 14 días, respectivamente, mientras que en animales con CUNP intensa, los valores alcanzados fueron $55.0\pm 2.2\%$ y $64.2\pm 4.6\%$ (Fig. 2.5a).

En el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal, la inmunoreactividad de galanina aumentó notoriamente luego de compresiones moderadas (Fig. 2.6a) o intensas (Fig. 2.6e), fundamentalmente en la zona central de la lámina II. Por el contrario, compresiones suaves sólo indujeron un incremento leve en la inmunoreactividad local del neuropéptido.

2.3. El tipo celular que expresa galanina también depende del grado de compresión del nervio

En ganglios controles (Figs. 2.1a y 2.3a) y contralaterales (Figs. 2.1b y 2.3b), la expresión de galanina se detectó únicamente en neuronas de pequeño tamaño (Figs. 2.2a,b y 2.4a,b). Como mencionamos anteriormente, las compresiones de grado variable indujeron un incremento gradual en el número de perfiles neuronales inmunoreactivos para galanina (Figs. 2.1c-e; 2.2a,b; 2.3c-e y 2.4a,b). Luego de una CUNP suave (Figs. 2.1c y 2.3c), este incremento se detectó únicamente en neuronas de pequeño tamaño (Figs. 2.2a,b y 2.4a,b), mientras que en animales con CUNP moderada (Figs. 2.1d y 2.3d) o intensa (Figs. 2.1e y 2.3e), también se observaron neuronas medianas y grandes galanina-IR (Figs. 2.2a,b y 2.4a,b).

2.4. Evolución temporal de la expresión de galanina luego de la injuria

La lesión del nervio ciático se tradujo en un aumento gradual en el número de neuronas aferentes primarias con inmunomarcación para galanina. El día 7 post lesión se observó un aumento significativo en el número de neuronas galanina-IR presentes en los ganglios ipsilaterales (CUNP suave: $12.8 \pm 1.4\%$, CUNP moderada: $46.5 \pm 2.4\%$, CUNP intensa: $55.0 \pm 2.2\%$), al compararlos con los contralaterales ($p < 0.001$ en todos los casos). En animales con CUNP moderada o intensa, este incremento en la expresión del neuropéptido fue aún mayor luego de 14 días de producida la lesión (CUNP moderada: $56.3 \pm 2.4\%$, CUNP intensa: $64.2 \pm 4.6\%$, $p < 0.001$ en ambos casos) (Fig. 2.5a). Sin embargo, mientras que en animales con CUNP moderada este incremento involucró

únicamente neuronas pequeñas (Figs. 2.5 b,c), en animales con CUNP intensa el aumento en la inmunoreactividad de galanina se observó tanto en neuronas pequeñas, como en medianas y grandes (Figs. 2.5 b,c). Finalmente, no se detectaron diferencias en el número de perfiles neuronales galanina-IR al comparar animales luego de 7 o 14 días de una CUNP suave ($12.8 \pm 1.4\%$ vs $13.1 \pm 1.7\%$, $p > 0.05$) (Fig. 2.5a).

Independientemente del grado de compresión del nervio, se observó una disminución significativa en los niveles de expresión del neuropéptido luego de 30 días de producida la lesión (CUNP suave: $5.1 \pm 1.1\%$, CUNP moderada: $19.3 \pm 2.0\%$, CUNP intensa: $27.8 \pm 2.2\%$, $p < 0.01$ en todos los casos). Niveles de expresión similares a los detectados en ganglios controles se alcanzaron a los 60 días en animales sometidos a una CUNP suave ($2.4 \pm 0.8\%$) o moderada ($3.1 \pm 1.0\%$). Por el contrario, en animales con CUNP intensa, aún 60 días después de la injuria se observó inmunoreactividad para galanina en un grupo de neuronas ($11.0 \pm 1.1\%$), fundamentalmente de pequeño tamaño.

Proyecto 3: Expresión de la enzima nNOS y producción de NO en los GARDs y la médula espinal de animales con axotomía de su nervio ciático

3.1. La axotomía del nervio ciático induce un importante incremento en la expresión de la enzima nNOS en los GARDs y en la médula espinal lumbar

En los ganglios raquídeos lumbares de animales controles (en los que se expuso el nervio ciático sin inducir ningún tipo de lesión) se detectó la expresión de la enzima nNOS únicamente en un bajo porcentaje ($2.0 \pm 0.4\%$) de neuronas de pequeño tamaño (Fig. 3.1a). En algunas de estas células se observó la presencia de procesos nNOS-IR (Fig. 3.1a). Lo mismo ocurrió en los ganglios contralaterales de animales axotomizados. Por el contrario, en los ganglios ipsilaterales a la lesión se observó un incremento significativo en el número de neuronas nNOS-IR (Figs. 3.1b-f). En este caso la expresión de la enzima se detectó no sólo en neuronas pequeñas sino también en algunas de mediano tamaño (Figs. 3.1b-f).

En el asta dorsal contralateral de la médula espinal de animales axotomizados se observaron numerosas fibras, terminales nerviosos e interneuronas locales pequeñas nNOS-IR, fundamentalmente en la lámina II interna (Fig. 3.1h). También se detectaron algunas neuronas de gran tamaño con procesos largos y gruesos, así como varias neuronas pequeñas localizadas alrededor del canal central (lámina X), todas ellas intensamente marcadas luego de incubar las secciones con el anticuerpo dirigido contra nNOS. El mismo patrón de inmunomarcación se observó en animales controles. La axotomía del nervio ciático indujo un importante aumento en la inmunoreactividad de la enzima, pudiéndose detectar numerosas fibras y terminales nerviosos nNOS-IR en la lámina II, tanto

interna como externa, del asta dorsal ipsilateral (Fig. 3.1g). También se observó una disminución marcada en el número de neuronas nNOS-IR de la lámina II (Fig. 3.1g).

3.2. Patrón temporal de expresión de la enzima luego de la injuria

Como se detalla en el apartado anterior, la axotomía del nervio ciático resultó en un aumento en la expresión de la nNOS en las neuronas aferentes primarias (Figs. 3.1b-f). Este aumento alcanzó valores estadísticamente significativos a los 7 días post injuria (Fig. 3.1b), detectándose inmunoreactividad para la enzima en el $23.2 \pm 2.5\%$ de las neuronas presentes en los GARDs L4-5. Los niveles de expresión de la nNOS aumentaron aún más a los 14 días post lesión (Fig. 3.1c), con $49.4 \pm 3.9\%$ de neuronas positivas, alcanzando un nivel máximo de expresión el día 28 (Fig. 3.1d), con $56.9 \pm 5.4\%$ de células nNOS-IR. A partir de entonces, los niveles de expresión de la enzima comenzaron a disminuir, detectándose la señal inmunoreactiva en el $51.4 \pm 5.3\%$ de las neuronas aferentes primarias el día 35 (Fig. 3.1e), y en el $9.4 \pm 1.3\%$ de las mismas el día 42 (Fig. 3.1f). La expresión de la enzima se detectó en neuronas de pequeño y mediano tamaño en todos los tiempos post lesión evaluados (Figs. 3.1b-f).

3.3. El aumento en la expresión de la enzima nNOS se acompaña de un aumento en la producción de NO

En los ganglios L4-5 y en la médula espinal lumbar de animales controles, se detectaron bajos niveles de nitritos y nitratos (Figs. 3.2a,b), indicando una baja producción de NO en situación basal. Lo mismo ocurrió en los ganglios y en el asta dorsal

contralateral de animales con axotomía de su nervio ciático, independientemente del tiempo post lesión evaluado (Figs. 3.2a,b). La injuria del nervio ciático indujo un aumento progresivo en la concentración de NOx, tanto en los ganglios lumbares (Fig. 3.2a) como en las astas dorsales (Fig. 3.2b) ipsilaterales a la lesión. Este incremento se hizo estadísticamente significativo a los 14 días post injuria, con un pico en la concentración de NOx el día 28 y posterior progresiva disminución hasta alcanzar niveles similares a los de animales controles el día 42 (Figs. 3.2a,b). Este perfil de concentración en función del tiempo fue similar en ganglios (Fig. 3.2a) y médulas (Fig. 3.2b) y se correlaciona con el perfil observado al estudiar los cambios en la expresión de la enzima.

Proyecto 4: Rol de las CEMO en modelos animales de dolor neuropático

4.1. Las CEMO migran selectivamente a los ganglios raquídeos lumbares afectados por la lesión del nervio periférico

Los resultados obtenidos en el marco del presente proyecto muestran que las CEMO inyectadas en el ganglio raquídeo L4, se implantan en el ganglio inyectado, adquiriendo una característica distribución perineuronal (Figs. 4.2a,b y 4.3b,c), y migran selectivamente a los otros ganglios raquídeos afectados por la lesión periférica (Figs. 4.1b-d y 4.2c-e).

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, los mismos fueron representados en un esquema que se muestra en la Figura 4.1. Debido a que se evaluaron animales con lesiones uni y bilaterales del nervio ciático (nervio derecho y/o izquierdo), en este proyecto el sitio de la inyección de las células (siempre en el ganglio L4 derecho) define los tejidos ipsi y contralaterales.

4.1.1. Animales con CUNP moderada ipsilateral a la inyección i.g. de CEMO (Fig. 4.1b)

En el ganglio L4 inyectado, se observó una gran cantidad de CEMO Hoechst-positivas, distribuidas tanto a lo largo de las fibras nerviosas intraganglionares, como rodeando a los cuerpos neuronales de las neuronas aferentes primarias (Figs. 4.2a,b y 4.3b,c), con una localización muy similar a la que tienen las células de la glia ganglionares.

El 0.19% del total de células inyectadas migró desde L4 y se implantó en alguno de los otros ganglios lumbares ipsilaterales (Nro. de CEMO Hoechst-positivas detectadas en los GARDs L3, L5 y L6 ipsilaterales: 389.00 ± 40.34). En todos los casos, la localización de las CEMO fue similar a la observada en los ganglios L4 inyectados: perifibrilar y perineuronal (Fig. 4.2c).

Se detectaron células Hoechst-positivas en los ganglios L3, L5 y L6 ipsilaterales al sitio de inyección (y a la lesión) (Fig. 4.1b). En todos los animales evaluados, se observó migración de las CEMO al ganglio L5 (Fig. 4.2c), mientras que en el 83% de los mismos ocurrió implantación de las células en los ganglios ipsilaterales L3 y/o L6. No se detectaron células Hoechst-positivas en ninguno de los ganglios lumbares contralaterales (Fig. 4.1b). Tampoco en los ganglios torácicos T10 ipsi o contralaterales.

4.1.2. Animales con CUNP moderada bilateral e inyección i.g. de CEMO unilateral (Fig. 4.1c)

En estos animales, pudimos detectar la presencia de células Hoechst-positivas en los ganglios lumbares bilaterales (Fig. 4.1c). En todos los animales estudiados observamos migración e implantación de las CEMO en los ganglios L5 y L6 ipsilaterales a la inyección de CEMO, así como en los ganglios L5 contralaterales. En el 66% de los animales se observó la presencia de células Hoechst-positivas en los ganglios L3 ipsi (Fig. 4.2d) y/o contralaterales. Finalmente, en los ganglios contralaterales L4 y/o L6 del 83% de los animales evaluados se detectó la presencia de CEMO. No se detectaron células Hoechst-positivas en los ganglios T10.

El número total de células Hoechst-positivas (565.83 ± 23.12) detectadas en alguno de los siete ganglios hacia los que ocurrió migración, representa el 0.28% del total de CEMO inyectadas en L4. La distribución de las CEMO tanto en los ganglios inyectados, como en aquellos hacia los que hubo migración, fue exactamente igual a la descrita en el punto anterior: perifibrilar y perineuronal.

4.1.3. Animales con CUNP moderada contralateral a la inyección i.g. de CEMO (Fig. 4.1d).

En este grupo de animales, las CEMO migraron desde el sitio de inyección en el ganglio L4, hacia los ganglios lumbares L3, L4, L5 y L6 contralaterales a la inyección (e ipsilaterales a la lesión) (Fig. 4.1d). En todos los animales evaluados, detectamos migración hacia los ganglios L4 y L5, mientras que en el 66% de los mismos, se observó implantación de las CEMO en los ganglios L3 y/o L6 (Fig. 4.2e). No se detectaron células Hoechst-positivas en los ganglios ipsilaterales a la inyección (y contralaterales a la lesión) L3, L5 y L6 (Fig. 4.1d). Tampoco en los ganglios T10 ipsi o contralaterales.

Alrededor del 0.20% del total de CEMO inyectadas en L4, migró y se implantó en alguno de los cuatro ganglios lumbares ipsilaterales a la lesión (Nro. de células Hoechst-positivas detectadas: 401.60 ± 43.85). En el ganglio L4 inyectado, las CEMO se distribuyeron heterogéneamente, sin una clara relación con neuronas y fibras. Por el contrario, en los ganglios L3-L6 hacia los que las CEMO migraron, las células adquirieron la característica distribución perifibrilar y perineuronal descrita en secciones anteriores.

4.1.4. Animales con CUNP moderada ipsilateral a la inyección i.g. de CEMO, sacrificados inmediatamente después de la cirugía

En este grupo control, detectamos células Hoechst-positivas únicamente en los ganglios L4 inyectados. La distribución de las mismas fue al azar, no mostrando ninguna asociación particular con las fibras o las neuronas ganglionares.

4.1.5. Animales con CUNP moderada ipsilateral a la inyección i.g. de CMN-H

Analizando este otro grupo control, observamos que las CMN-H se distribuyeron heterogéneamente en los ganglios L4 inyectados (Fig. 4.2f), y no migraron a ninguno de los ganglios lumbares afectados por la lesión del nervio periférico.

4.1.6. Control histológico del sitio de la lesión (nervio) e inyección (ganglio)

La observación microscópica de los nervios comprimidos y sus correspondientes criosecciones permitió determinar con exactitud el grado de compresión de cada nervio. En este proyecto se incluyeron únicamente aquellos animales en los que el diámetro del nervio se redujo en un 40-80% de su tamaño original. La observación microscópica permitió también detectar una zona de edema y presencia de tejido fibroso en el sitio de la ligadura.

En los ganglios raquídeos inyectados se observó un ligero edema, con aumento de alrededor del 15% de su volumen. Luego de 5 días, el ganglio recuperó su tamaño original.

En el sitio de la inyección se detectó la presencia de tejido fibroso e infiltración macrofágica.

4.2. Las neuronas aferentes primarias y las células gliales ganglionares expresan factores quimiotácticos en respuesta a la injuria

En los ganglios lumbares contralaterales de animales con CUNP moderada no se observó inmunoreactividad para MCP-1 α (Fig. 4.4a). Lo mismo sucedió al evaluar los ganglios contralaterales de animales con CUNP moderada e inyección i.g. de CEMO o PBS. Por el contrario, en los ganglios ipsilaterales de animales pertenecientes a cualquiera de los tres grupos citados se observaron numerosos perfiles neuronales intensamente inmunoreactivos (Figs. 4.4b,d). En todos los casos, la señal inmunoreactiva se detectó en el citoplasma de alrededor del 15% de las neuronas aferentes primarias, fundamentalmente de pequeño y mediano tamaño, con presencia de procesos neuronales MCP-1 α -IR en algunas de ellas (Figs. 4.4c,e).

En los ganglios contralaterales de animales pertenecientes a los tres grupos en estudio se detectaron escasas células gliales SDF-1-IR. Luego de la injuria periférica se produjo un notable incremento en la inmunoreactividad de dicho factor quimiotáctico en los ganglios L4-5 ipsilaterales. La señal inmunoreactiva se detectó siempre en células gliales, con ausencia de neuronas SDF-1-IR. No se observaron diferencias entre ganglios de animales con CUNP sola o con CUNP e inyección i.g. de CEMO o PBS.

4.3. Las CEMO previenen la alodinia mecánica y reducen la alodinia térmica al frío en animales con CUNP moderada de su nervio ciático

Los animales con CUNP moderada desarrollaron alodinia frente a estímulos mecánicos (Figs. 4.5a,b y 4.7a) y térmicos fríos (Figs. 4.6a,b y 4.7b) en su pata posterior ipsilateral a la lesión. La administración i.g. de CEMO logró prevenir el desarrollo de alodinia mecánica (Figs. 4.5a,b y 4.7a) y redujo significativamente el número de respuestas dolorosas frente a estímulos fríos (Figs. 4.6a,b y 4.7b). Por el contrario, la administración i.g. de PBS o CMN-H no previno el desarrollo de alodinia, produciendo incluso un aumento en el número de respuestas dolorosas en algunos casos (Figs. 4.5a,b, 4.6a,b y 4.7a,b).

4.3.1. Control conductual previo a la injuria

Todos los animales fueron evaluados en su conducta nociceptiva antes de realizar las cirugías (día 0) de modo de descartar aquellos que presentaran un comportamiento anormal. Los animales incluidos en los experimentos no desarrollaron respuestas dolorosas al ser estimulados con filamentos de hasta 26 gramos fuerza o con una gota de acetona (Figs. 4.5a,b y 4.6a,b).

4.3.2. Animales con CUNP moderada únicamente

Todos estos animales presentaron conductas de protección y cambios en la postura del miembro lesionado, incluyendo flexión plantar y retracción de los dedos. A las 24

Después de producida la lesión (día 1), detectamos una disminución en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos (Figs. 4.5a,b) y un aumento en el número de respuestas dolorosas frente a estímulos térmicos fríos (Figs. 4.6a,b). Luego de 3 días, todos los animales mostraron una marcada reducción en el umbral de respuesta a los filamentos de von Frey, y alrededor del 67% de los mismos desarrolló un comportamiento francamente alodínico, es decir, manifestó dolor al ser estimulado con filamentos de 6 gramos fuerza o menos (Figs. 4.5a,b). Al evaluar los animales con el test de Choi, detectamos un aumento significativo en el número de respuestas dolorosas frente a estímulos fríos (Figs. 4.6a,b). Si bien el mayor nivel de alodinia mecánica y térmica se detectó el día 3, los animales mantuvieron aumentada su sensibilidad frente a ambos tipos de estímulos hasta los 56 días post lesión.

4.3.3. Animales con CUNP moderada ipsilateral a la inyección i.g. de CMN-H o PBS

Ambos grupos de animales mostraron un comportamiento muy similar al de aquellos sometidos a la compresión únicamente: disminución del umbral nociceptivo al ser estimulados con los filamentos de von Frey el día 1, alcance de niveles alodínicos el día 3 y mantenimiento de las respuestas dolorosas aún 56 días después de producida la lesión (Figs. 4.5a,b y 4.7a). Frente a la estimulación con acetona, el patrón de respuesta de estos animales fue también muy similar al observado en animales con CUNP únicamente (Figs. 4.6a,b y 4.7b). El grupo que recibió la inyección i.g. de PBS desarrolló el mayor nivel de alodinia térmica el día 3 post lesión (Figs. 4.6a,b). En cambio, el grupo con CUNP e inyección i.g. de CMN-H lo hizo a los 7 días, alcanzando un número de respuestas dolorosas significativamente mayor al detectado en animales con CUNP únicamente (Figs. 4.6a,b).

4.3.4. Animales con CUNP moderada ipsilateral a la inyección i.g. de CEMO

Los animales que recibieron el tratamiento con CEMO mostraron una leve disminución en el umbral de respuesta frente a estímulos mecánicos (Figs. 4.5a,b y 4.7a). En todos los tiempos evaluados, esta disminución fue significativamente menor a la detectada en animales con CUNP únicamente, con CUNP e inyección de PBS, o con CUNP y administración de CMN-H, sin alcanzar niveles alodínicos (Figs. 4.5a,b y 4.7a). En cuanto a los resultados obtenidos con el test de Choi, si bien en los animales tratados con CEMO se detectó un leve incremento en el número de respuestas dolorosas, el mismo fue menor al observado en los tres grupos controles (Figs. 4.6a,b y 4.7b). Aún en el período de mayor alodinia térmica (día 3), los animales que recibieron la inyección de CEMO presentaron un número de respuestas positivas significativamente menor al detectado en los animales pertenecientes a los tres grupos controles (Figs. 4.6a,b).

4.4. Las CEMO modifican la expresión de diversas moléculas que participan en la neurotransmisión nociceptiva

4.4.1. *NPY*, Y_1 y *galanina*

En los ganglios contralaterales de animales pertenecientes a cualquiera de los cuatro grupos estudiados se observaron escasos perfiles neuronales NPY- o galanina-IR (Figs. 4.8a,d,j). Mientras que la expresión de NPY se detectó en neuronas medianas y grandes (Fig. 4.8a), la señal inmunoreactiva para galanina se observó en cuerpos

neuronales de pequeño tamaño (Fig. 4.8d). Por el contrario, se detectó una gran cantidad de perfiles neuronales Y_1 -IR (alrededor del 20% de las neuronas aferentes primarias) (Figs. 4.8g,j). La inmunomarcación para este receptor se localizó en la membrana plasmática de neuronas pequeñas (Fig. 4.8g).

En animales sometidos a una CUNP moderada, ya sea sola o seguida de la inyección i.g. de PBS o CMN-H, se observó un importante incremento en el número de perfiles neuronales NPY- y galanina-IR en los ganglios lumbares L4-5 ipsilaterales a la lesión (Figs. 4.8b,e,j). La señal inmunoreactiva para NPY se detectó en neuronas medianas y grandes, con tinción citoplasmática de aspecto granular y neuronas intensamente teñidas (Fig. 4.8b). El aumento en la expresión del neuropéptido galanina se detectó tanto en neuronas pequeñas, como medianas y grandes (Fig. 4.8e). Los niveles de expresión de los neuropéptidos fueron similares en los animales con CUNP únicamente y en aquellos con CUNP e inyección i.g. de PBS o CMN-H. En cuanto a la expresión del receptor Y_1 , la lesión del nervio periférico indujo una disminución en el número de neuronas pequeñas Y_1 -IR (Figs. 4.8h,j), no observándose diferencias en los niveles de expresión en los tres grupos controles.

La administración i.g. de CEMO atenuó los cambios en la expresión de neuropéptidos inducidos por la injuria periférica (Figs. 4.8c,f,i,j). De este modo, si bien el número de neuronas NPY- y galanina-IR aumentó en los ganglios lumbares ipsilaterales a la lesión este aumento fue significativamente menor al observado en los animales pertenecientes a los tres grupos controles (Figs. 4.8c,f,j). Por otra parte, la administración de CEMO previno la disminución en los niveles de expresión del receptor Y_1 (Figs.

4.8i,j), manteniéndose un número de perfiles neuronales inmunoreactivos similar al observado en los ganglios contralaterales (Figs. 4.8g,j).

4.4.2. *nNOS*

En los ganglios lumbares contralaterales de los cuatro grupos en estudio, se observó un escaso número de neuronas de pequeño tamaño nNOS-IR (Figs. 4.9a,g), con presencia de procesos neuronales inmunoreactivos en algunas de ellas (Figs. 4.9a,b). En los ganglios ipsilaterales de animales con CUNP moderada se observó un incremento significativo en el número de neuronas pequeñas y medianas nNOS-IR (Figs. 4.9c,g). La administración i.g. de CEMO indujo un incremento aún mayor en el número de perfiles neuronales inmunoreactivos (Figs. 4.9e,g). Este incremento fue del 40% con respecto a animales con CUNP únicamente (Figs. 4.9c,g). La inyección i.g. de PBS (Fig. 4.9g) o CMN-H no indujo ninguna modificación adicional en los niveles de expresión de la enzima, detectándose un número total de neuronas nNOS-IR similar al observado en animales con CUNP únicamente (Figs. 4.9c,g).

Al evaluar los niveles de expresión de la enzima mediante la técnica de Western Blot se detectó un incremento del 50% en la densidad óptica de la banda de 130 kDa correspondiente a la nNOS, al comparar animales con CUNP y administración de CEMO con aquellos sometidos a CUNP únicamente. No se observaron diferencias al comparar la densidad óptica de las bandas obtenidas en las calles correspondientes a animales con CUNP, CUNP y administración de PBS o CUNP y administración de CMN-H.

4.4.3. *Trk_A* fosforilado

El análisis de la densidad óptica de las bandas correspondientes a un peso molecular de 140 kDa, compatible con el peso molecular reportado del receptor *trk_A*, mostró un incremento del 25% en animales con CUNP e inyección intraganglionar de CEMO, al compararla con los tres grupos controles.

4.5. Fenotipo de las CEMO transplantadas

Tanto *in vitro* como *in vivo* luego de 7, 14 o 21 días de ser transplantadas, las CEMO Hoechst-positivas mostraron inmunoreactividad para los marcadores de CMM STRO-1, CD73 y CD49 α . No logramos detectar la expresión de marcadores neurales (nestin), neuronales (NeuN, Neurofilamento M, β -III-tubulina) o gliales (GFAP) en las CEMO en cultivo o *in vivo* luego de 7, 14 o 21 días de realizado el trasplante.

Proyecto 5: Efecto de la administración del ODN IMT504 a animales con una compresión mecánica aguda de su nervio ciático

5.1. La administración de IMT504 previene la generación de alodinia mecánica y reduce la alodinia térmica al frío en animales con CMA de su nervio ciático

Todos los animales mostraron un comportamiento normal al ser evaluados con el test de von Frey y el test de Choi antes de realizar la cirugía (día 0) (Figs. 5.1b y 5.2b). En ambos grupos de animales utilizados como control (con CMA del nervio ciático e inyección subcutánea de SF o intravascular de PBS) se detectaron conductas de protección y cambios en la postura del miembro lesionado incluyendo flexión plantar y retracción de los dedos, evidenciándose un aumento de la sensibilidad a estímulos mecánicos en la pata trasera ipsilateral a la lesión a partir del día 1 de producida la injuria (Figs. 5.1a,b). Este aumento de la sensibilidad condujo al desarrollo de respuestas en el rango alodínico (respuestas dolorosas desencadenadas por filamentos de 6 gramos fuerza o menos), detectadas a partir del día 3 y hasta el día 10 post lesión (Figs. 5.1a,b). El día 14, los animales aún mostraban una importante disminución en el umbral de respuesta, si bien ya no en el rango alodínico (Figs. 5.1a,b). Finalmente, el día 21 se observó un aumento del umbral, alcanzando valores similares a los detectados antes de realizar la cirugía, evidenciando la tendencia de los animales a la recuperación (Figs. 5.1a,b). Como en ambos grupos de animales controles el patrón de respuestas detectado fue exactamente igual, sólo se muestran en los gráficos los resultados correspondientes al grupo con CMA e inyección subcutánea de SF (Figs. 5.1a,b).

Los resultados obtenidos al evaluar los animales controles (CMA del nervio ciático e inyección subcutánea de SF o intravascular de PBS) con el test de Choi siguieron un patrón similar al observado al hacer el testeo con los filamentos de von Frey. Se evidenció un aumento en el número de respuestas dolorosas al estimular la pata trasera ipsilateral a partir del día 1, detectándose el mayor número de respuestas positivas el día 3, y manteniendo los niveles alodínicos hasta el día 14 (Figs. 5.2a,b). Recién el día 21 se observó una normalización de la respuesta frente a la estimulación con acetona (Figs. 5.2a,b). Como en ambos grupos de animales controles el patrón de respuestas detectado fue exactamente igual, sólo se muestran en los gráficos los resultados correspondientes al grupo con CMA e inyección subcutánea de SF (Figs. 5.2a,b).

La conducta nociceptiva de los animales tratados, ya sea con IMT504 en forma subcutánea o con CEMO por vía intravascular, fue muy similar, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Figs. 5.1a,b y 5.2a,b). Si bien los dos grupos de animales mostraron una leve disminución del umbral de respuesta frente a estímulos mecánicos, no se alcanzaron en ningún momento niveles alodínicos, logrando ambos tratamientos prevenir el desarrollo de alodinia mecánica (Figs. 5.1a,b). Con respecto a los resultados obtenidos con el test de Choi, se observó un leve incremento en el número de respuestas positivas en ambos grupos tratados, pero manteniendo siempre niveles de sensibilidad menores a los observados en los animales controles (Figs. 5.2a,b). En particular, el tratamiento con IMT504 demostró ser más efectivo en la prevención de la alodinia térmica en animales evaluados a los 3 y 7 días post lesión (Figs. 5.2a,b).

5.2. Expresión de marcadores de CMM en los tejidos afectados por la injuria

Al realizar la observación microscópica de secciones de los nervios y los ganglios de animales con CMA e inyección subcutánea de IMT504 o SF, no logramos detectar la presencia de células STRO-1, CD73 o CD49 α positivas.

5.3. La administración de IMT504 no modifica la expresión de los neuropéptidos NPY y galanina, el receptor Y₁ de NPY y la enzima nNOS

Al analizar la inmunoreactividad de los neuropéptidos NPY y galanina, del receptor Y₁ de NPY, y de la isoforma neuronal de la enzima NOS en neuronas aferentes primarias observamos que los niveles de expresión de los cuatro marcadores fueron similares en los animales pertenecientes a los dos grupos estudiados, no detectándose diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas inmunoreactivas observadas en animales con CMA y administración de SF ó IMT504.

En los ganglios contralaterales de animales pertenecientes a los dos grupos en estudio, la expresión de galanina y NPY se detectó únicamente en un bajo porcentaje de neuronas pequeñas y medianas-grandes, respectivamente, independientemente del tiempo post lesión evaluado. En los ganglios ipsilaterales, por el contrario, la lesión del nervio ciático indujo un importante incremento en el número de neuronas NPY- y galanina-IR a los 3 y 7 días de inducida la CMA, detectándose la expresión de NPY en neuronas medianas y grandes, y la de galanina en neuronas pequeñas, medianas y grandes. En

animales evaluados luego de 14 días se comenzó a detectar una disminución en el número de neuronas NPY- y galanina-IR, y el día 21 los niveles de expresión de ambos neuropéptidos alcanzaron valores similares a los detectados en los ganglios contralaterales.

Como se mostró que ocurre en otros modelos de lesión (Proyectos 1 y 4 de la presente Tesis), la expresión del receptor Y_1 disminuyó en los ganglios ipsilaterales luego de la injuria. En este caso, el menor número de neuronas Y_1 -IR se detectó a los 3 días post lesión, observándose un leve incremento a los 7 días, con recuperación de los niveles normales de expresión el día 14. En todos los casos, la señal inmunoreactiva se detectó en la membrana plasmática de neuronas de pequeño tamaño.

Finalmente, al analizar la presencia de neuronas nNOS-IR, se observó que en los ganglios contralaterales la inmunoreactividad para la enzima se limitó a un bajo porcentaje de neuronas de pequeño tamaño, mientras que en ganglios ipsilaterales se detectó su presencia en un mayor número de neuronas aferentes primarias, no sólo pequeñas, sino también medianas. El mayor número de neuronas nNOS-IR se detectó a los 7 días post lesión. Los niveles de expresión de la enzima alcanzaron nuevamente valores normales el día 21.

Como ya se aclaró, los niveles de expresión de los cuatro marcadores fueron similares en los dos grupos experimentales incluidos en este proyecto: el tratamiento con IMT504 no indujo cambios adicionales en la expresión de NPY, galanina, Y_1 o nNOS. Como la inmunoreactividad de estos marcadores en neuronas aferentes primarias de animales controles y sometidos a diferentes tipos de lesión del nervio ciático ya fue

mostrada en capítulos anteriores, no se han incluido las correspondientes fotografías en el presente proyecto.

Discusión

Proyecto 1: Efecto de la inyección intraneural de colchicina sobre la expresión del NPY y su receptor Y₁ en las neuronas aferentes primarias

Nuestros resultados muestran un incremento significativo en el número de perfiles neuronales NPY-IR, con una paralela disminución en el número de neuronas que expresan el receptor Y₁ en los GARDs L4-5 de animales con inyección intraneural de colchicina. Estos cambios coinciden con los descritos por otros autores luego de diferentes tipos de injuria mecánica del nervio ciático (Wakisaka et al., 1992, Nahin et al., 1994, Shi et al., 1999, Landry et al., 2000, Brumovsky et al., 2004, Hökfelt et al., 2007). Sin embargo, en nuestro modelo experimental no se produce un daño directo de la fibra nerviosa sino un bloqueo del transporte axonal. La desregulación observada en la expresión del NPY y su receptor en las neuronas aferentes primarias podría deberse a una deprivación de factores neurotróficos como consecuencia del bloqueo de transporte axonal retrógrado.

El sistema de transporte axonal rápido está mediado por la interacción molecular de los microtúbulos con dos proteínas, dineína y kinesina, y permite el traslado de metabolitos, macromoléculas y organelas desde y hacia el soma neuronal (Strott and Ray, 1977, Ginn and Peterson, 1992). En condiciones normales, numerosos factores neurotróficos producidos por los tejidos periféricos son trasladados a lo largo de los axones hasta el soma neuronal, utilizando este sistema de transporte (Korsching and Thoenen, 1983, DiStefano et al., 1992). Las neuronas aferentes primarias son particularmente sensibles al NGF, al BDNF y a la neurotrofina 3 (NT-3), ya que expresan sus receptores específicos Trk_A, Trk_B y Trk_C, respectivamente. En condiciones normales, los transcriptos primarios del NGF y de la NT-3 son prácticamente indetectables en los ganglios

raquídeos (Ernfors et al., 1990), mientras que, curiosamente, se detectan cantidades apreciables de ambos factores por inmunohistoquímica (Lee et al., 1998, Obata et al., 2002). Estas observaciones sugieren que la acumulación de dichos factores neurotróficos en las neuronas aferentes primarias se produce como consecuencia de su transporte desde los tejidos periféricos por vía axonal retrógrada. El BDNF, por el contrario, es normalmente sintetizado en las neuronas aferentes primarias y transportado en forma anterógrada hacia los terminales periféricos y centrales, comportándose como un neurotransmisor (McMahon and Priestley, 1995).

Por definición, los factores neurotróficos favorecen la supervivencia, el crecimiento y el mantenimiento de poblaciones neuronales específicas (McMahon and Priestley, 1995). También regulan diversas propiedades neuronales como los niveles de expresión de neurotransmisores, neuromoduladores y las enzimas involucradas en su síntesis (McMahon and Priestley, 1995), tanto en condiciones normales, como luego de una lesión. En animales con axotomía de su nervio ciático, la administración tópica de NGF en el extremo proximal del nervio seccionado logra revertir los cambios neurofisiológicos y neuroquímicos inducidos por la lesión (Fitzgerald et al., 1985). En particular, el incremento en la expresión del NPY desencadenado por la axotomía es parcialmente revertido luego de la administración intratecal de NGF (Verge et al., 1995). Por lo tanto, es factible suponer que el aumento observado en la expresión del NPY en nuestro modelo experimental se deba a una reducción en el aporte de NGF desde la periferia como consecuencia de la administración de colchicina.

Se ha documentado que luego de una lesión se produce un incremento en la

síntesis de factores tróficos en los GARDs (Shen et al., 1999, Obata et al., 2002). Este aumento en la producción local de neurotrofinas podría explicar la disminución del número de neuronas NPY-IR observada a partir del día 21 post lesión.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la inyección intraneural de colchicina induce la degeneración axonal (Aquino et al., 2006). En los segmentos distales de los nervios inyectados con colchicina se observa una redistribución de las proteínas de mielina, en particular de la proteína básica de mielina (MBP, *Myelin Basic Protein*), con formación de los acúmulos elipsoides característicos del proceso de degeneración walleriana, a partir del día 7 de inducida la injuria. La cantidad de acúmulos observados aumenta en forma directamente proporcional a la concentración de la solución de colchicina inyectada. Este patrón de inmunomarcación se mantiene hasta el día 14 post injuria, y a partir del día 28 se observa una normalización en la inmunomarcación de la proteína mayoritaria de la mielina. La inyección de colchicina genera asimismo, una alteración en la distribución normal de proteínas axonales como el producto proteico del gen 9.5 (PGP 9.5, *Protein Gene Product 9.5*) y la β -III-tubulina, el isotipo de β -tubulina específico de neuronas, que se reorganizan en clusters, al producirse la degeneración de la fibra nerviosa. Los cambios en la distribución de las proteínas axonales anteceden a los observados en la expresión de MBP, sugiriendo que la degeneración axonal ocurre previamente al proceso de degeneración de la mielina.

Nuestros experimentos muestran una relación directa entre la magnitud de los cambios en los niveles de expresión del neuropéptido y su receptor, y la concentración de

la solución de colchicina inyectada, coincidiendo con los cambios graduales observados en el patrón de inmunomarcación de la proteína MBP (Aquino et al., 2006), y sugiriendo la afectación de un número progresivamente mayor de fibras nerviosas al administrar soluciones de colchicina de concentración creciente.

Queda aún por definir el significado funcional de este incremento en la expresión del NPY, acompañado por una concomitante reducción en la inmunoreactividad de su receptor Y_1 . Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la administración de colchicina induce cambios en la conducta nociceptiva de los animales, observándose una disminución en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos y térmicos, con la consiguiente generación de alodinia los días 3 y 7 luego de producida la injuria. Curiosamente el incremento observado en la inmunoreactividad del NPY, así como la disminución del receptor Y_1 , coinciden con este período de mayor intensidad en las respuestas dolorosas. Teniendo en cuenta que se ha documentado la liberación de neuropéptidos desde el soma de las neuronas aferentes primarias (Huang and Neher, 1996, Ulrich-Lai, 2001), se podría postular que el incremento en la producción local del neuropéptido se traduciría en una mayor liberación desde los cuerpos neuronales activando sus receptores presentes en neuronas adyacentes. Dada la disminución observada en la expresión del receptor Y_1 luego de la injuria, este mecanismo no sería predominante, y si lo sería la activación del receptor Y_2 , cuya expresión aumenta en neuronas pequeñas y medianas luego de la lesión del nervio (Zhang et al., 1997, Landry et al., 2000), y cuya activación conduce a un incremento de la excitabilidad neuronal (Abdulla and Smith, 1999), con la consiguiente generación de dolor.

Proyecto 2: Expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias de animales con diferentes grados de compresión de su nervio ciático

En este trabajo mostramos que la compresión del nervio ciático induce un importante incremento en la expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias (Coronel et al., 2007a). Nuestros resultados se correlacionan con estudios previos que muestran la presencia de escasos perfiles neuronales galanina-IR en los ganglios raquídeos y en la médula espinal lumbar de animales controles, y el aumento que se produce en la inmunoreactividad del neuropéptido luego de diferentes tipos de injuria periférica (Hökfelt et al., 1987, Villar et al., 1989, Nahin et al., 1994, Ma and Bisby, 1997, Zhang et al., 1998, Shi et al., 1999).

En los ganglios lumbares de animales controles, la señal inmunoreactiva para galanina se detectó únicamente en un escaso número de neuronas de pequeño tamaño. Se ha descrito que en dichas neuronas galanina colocaliza con otros neuropéptidos como la sustancia P y el CGRP (Ju et al., 1987, Villar et al., 1989). La galanina sintetizada en los cuerpos neuronales situados en los GARDs es transportada por las proyecciones centrales hacia las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (Tuchscherer and Seybold, 1989). Nuestros estudios muestran la presencia de numerosos terminales nerviosos y fibras, así como también interneuronas locales galanina-IR, fundamentalmente en las láminas superficiales I y II. Dichas interneuronas son de tipo inhibitorio y coexpresan el neurotransmisor GABA (Simmons et al., 1995). También se ha demostrado la colocalización de galanina con encefalina (Zhang et al., 1995), un péptido opioide endógeno con funciones principalmente inhibitorias.

En animales con CUNP del nervio ciático se observó un incremento significativo en la inmunoreactividad de galanina tanto en los ganglios como en la médula lumbar. Nuestros resultados indican que la magnitud de dicho incremento se relaciona en forma directa con la intensidad de la compresión. En animales con una CUNP suave se observó un moderado aumento en el número de neuronas galanina-IR, siendo estas de pequeño tamaño, mientras que luego de compresiones moderadas o intensas el número de perfiles neuronales inmunoreactivos fue significativamente mayor, involucrando también neuronas medianas y grandes (Coronel et al., 2007a).

Estos datos sugieren una afectación diferencial de las fibras aferentes primarias como consecuencia de la injuria. En condiciones de daño leve (CUNP suave), las fibras amielínicas parecieran ser más sensibles a la lesión que las fibras mielínicas gruesas, mientras que luego de compresiones de mayor intensidad (CUNP moderada o intensa) las fibras mielínicas también se verían afectadas. De hecho, otros autores han mostrado que la compresión del nervio ciático utilizando tubuladuras de polietileno de diámetro interno decreciente resulta en un aumento progresivo en el número de fibras mielínicas afectadas, además de producir un daño continuo de las fibras C (Mosconi and Kruger, 1996).

Este incremento progresivo en el número y el tipo de fibras dañadas permite explicar el aumento gradual en la expresión de galanina. Se podría especular que las compresiones suaves sólo afectan un pequeño grupo de fibras amielínicas, resultando en un aumento en la expresión de galanina en neuronas pequeñas. Por el contrario, compresiones moderadas e intensas probablemente lesionan todos los tipos de fibras, induciendo la expresión de galanina en neuronas pequeñas, medianas y grandes.

Otros autores también han observado un incremento diferencial en la expresión de galanina al comparar diferentes tipos de lesión del nervio ciático (Ma and Bisby, 1997). El número total de neuronas galanina-IR detectado en animales con una transección parcial del nervio ciático es mayor que en aquellos con axotomía (Ma and Bisby, 1997). Independientemente del tipo de lesión, y en concordancia con nuestros resultados, este incremento involucra principalmente neuronas de pequeño tamaño. Sin embargo, en animales con transección parcial se observa una mayor cantidad de neuronas medianas y grandes galanina-IR (Ma and Bisby, 1997).

Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que compresiones de intensidad creciente del nervio ciático inducen cambios graduales en la expresión del neuropéptido Y y su receptor Y_1 en las neuronas aferentes primarias (Brumovsky et al., 2004). El aumento en el grado de compresión del nervio se relaciona con recuentos progresivamente mayores de neuronas de gran tamaño NPY-IR, así como con una progresiva disminución en el número de perfiles neuronales pequeños Y_1 -IR (Brumovsky et al., 2004).

El desarrollo de conductas asociadas al dolor neuropático también se relaciona con el grado de compresión del nervio (Brumovsky et al., 2004). De este modo, las compresiones suaves generan un incremento modesto en la sensibilidad frente a estímulos mecánicos (test de von Frey), mientras que compresiones moderadas inducen franca alodinia (Brumovsky et al., 2004). Los animales con CUNP moderada también desarrollan alodinia térmica al ser evaluados con el test de Choi (Musolino et al., 2007). Por el contrario, los animales sometidos a una CUNP intensa no muestran signos de

alodinia (Brumovsky et al., 2004), probablemente debido a la ausencia de conducción de la información nociceptiva a través del sitio de compresión severa. El hecho de que las compresiones moderadas sean más efectivas que las suaves en inducir alodinia mecánica probablemente se deba al mayor número de fibras de pequeño calibre afectadas, así como a la incorporación de fibras mielínicas dañadas.

En relación al patrón temporal de expresión de galanina, el mayor número de neuronas galanina-IR se detectó a los 14 días de producida la lesión en animales con CUNP moderada o intensa. Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar animales 7 o 14 días después de una CUNP suave. Estos resultados coinciden con estudios previos que muestran que los máximos niveles de galanina y su mensajero se detectan 10-14 días después de una axotomía (Villar et al., 1989, Villar et al., 1991, Ma and Bisby, 1997). A los dos meses de inducida la injuria se recuperaron los niveles normales de expresión del neuropéptido en animales con CUNP suave o moderada. Sin embargo, en los animales con CUNP severa se detectaron niveles de galanina aún elevados. Esta observación puede reflejar los esfuerzos persistentes de las neuronas aferentes primarias de permanecer viables e intentar la regeneración de sus axones dañados. De hecho, se ha asociado a la galanina con el proceso de regeneración y la sobrevivencia neuronal (Holmes et al., 2005, Shi et al., 2006a).

En las láminas superficiales del asta dorsal ipsilateral de animales sometidos a compresiones moderadas o intensas observamos un incremento marcado en la inmunoreactividad para galanina. Esta observación coincide con datos previos que

muestran que el aumento en la expresión de galanina en los ganglios lumbares luego de una injuria se traduce en un incremento en su transporte y liberación en el asta dorsal (Colvin et al., 1997, Colvin and Duggan, 1998), siendo esta liberación aún mayor si se estimulan eléctricamente las fibras C (Colvin et al., 1997, Colvin and Duggan, 1998).

Nuestros resultados muestran claramente el incremento que se produce en la expresión de galanina en las neuronas aferentes primarias luego de una compresión del nervio ciático. Aún se desconoce el correlato funcional de este cambio fenotípico. Como se mencionó en la Introducción, se le han atribuido a galanina efectos pro y antinociceptivos que probablemente se deben a su acción sobre diferentes subtipos de receptores (Xu et al., 2000, Wiesenfeld-Hallin and Xu, 2001, Liu and Hökfelt, 2002).

La expresión de los receptores de galanina también sufre modificaciones luego de una lesión nerviosa periférica. Los niveles del GalR1 disminuyen en los GARDs (Xu et al., 1996, Zhang et al., 1998) pero no se ven modificados en el asta dorsal de animales con axotomía de su nervio ciático (Xu et al., 1996, Brumovsky et al., 2006c). Por su parte, la expresión del GalR2 también disminuye en los GARDs (Shi et al., 1997, Zhang et al., 1998) mientras que aumenta significativamente en el asta ventral de animales axotomizados (Brumovsky et al., 2006c).

Se considera que el GalR1 media los efectos antinociceptivos de la galanina, mientras que se ha asociado al GalR2 con sus efectos pronociceptivos (Liu and Hökfelt, 2002, Wiesenfeld-Hallin et al., 2005, Brumovsky et al., 2006c, Brumovsky et al., 2007). A nivel espinal, la activación de los receptores presinápticos GalR2 estaría

mediando los efectos excitatorios, pronociceptivos de bajas dosis de galanina (Kerr et al., 1998, Liu et al., 2001), al causar un aumento de la excitabilidad neuronal, favoreciendo la liberación de neurotransmisores (Branchek et al., 2000). Luego de la injuria periférica, la creciente liberación de galanina por las terminales aferentes induciría efectos inhibitorios, antinociceptivos, por acción sobre el GalR1 expresado en una subpoblación de interneuronas, fundamentalmente glutamatérgicas, de la lámina II del asta dorsal (Pooga et al., 1998, Liu et al., 2001, Hua et al., 2004, Landry et al., 2004, Landry et al., 2005).

Proyecto 3: Expresión de la enzima nNOS y producción de NO en los GARDs y la médula espinal de animales con axotomía de su nervio ciático

Los resultados presentados en el marco de este proyecto confirman que en condiciones normales sólo un escaso porcentaje de neuronas aferentes primarias, fundamentalmente de pequeño tamaño, expresan nNOS. Luego de la axotomía del nervio ciático se produjo un incremento importante en la inmunoreactividad de la enzima, tanto en los ganglios raquídeos, como en el asta dorsal ipsilateral a la injuria (Coronel et al., 2005). Nuestros resultados también muestran un incremento en la producción de NO en los ganglios y en la médula espinal lumbar luego de la axotomía (Coronel et al., 2005), sugiriendo un aumento paralelo en la actividad de la enzima.

Luego de la injuria, la inmunoreactividad de la nNOS se detectó en neuronas aferentes primarias de pequeño y mediano tamaño, sugiriendo la participación del NO en la neurotransmisión del dolor. Estudios inmunohistoquímicos previos han revelado que la nNOS sintetizada a nivel del soma de las neuronas aferentes primarias es transportada hacia las proyecciones periféricas (Fiallos Estrada et al., 1993) y centrales (Meller and Gebhart, 1993) de estas neuronas. En condiciones normales se observan numerosas fibras, terminales y células nNOS-IR en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. Teniendo en cuenta que los niveles de la enzima (resultados aquí presentados) y su mensajero (Verge et al., 1992a) son sumamente bajos en los ganglios controles, sólo pequeñas cantidades de la misma pueden ser transportadas a lo largo de las raíces dorsales, hacia la médula espinal. En consecuencia, es probable que la mayoría de los terminales y fibras nNOS-IR que se observan en el asta dorsal correspondan a neuronas locales. Su

presencia a nivel de las láminas superficiales I y II contribuye a involucrar al NO en la neurotransmisión nociceptiva.

La axotomía del nervio ciático resultó en una disminución en el número de neuronas locales nNOS-IR, así como en un incremento marcado en el número de fibras nerviosas inmunoreactivas en el asta dorsal. Estas observaciones sugieren que luego de la injuria periférica se produce una disminución en la síntesis local de la enzima, mientras que su transporte desde los ganglios lumbares hacia los terminales aferentes primarios en la médula espinal se ve incrementado.

Por otra parte, el aumento observado en la expresión de la enzima en los ganglios ipsilaterales al nervio axotomizado probablemente se traduzca en un mayor transporte de la misma hacia las proyecciones periféricas de las neuronas aferentes primarias. El NO producido a nivel de los axones seccionados estaría mediando cambios en la microcirculación del nervio e influyendo en sus posibilidades de regeneración (Zochodne, 2000). Se ha propuesto que el NO participa activamente en la degeneración del axón y de la vaina de mielina (Zochodne and Levy, 2005), procesos que deben necesariamente ocurrir para permitir la posterior regeneración. Por otra parte, la producción excesiva de NO puede ocasionar daño de los conos de crecimiento del axón en proceso de regeneración (Zochodne and Levy, 2005).

Se ha sugerido que el aumento en la expresión de la enzima observado en los ganglios lumbares luego de una transección del nervio ciático se debe, al menos en parte, a la privación de NGF (Thippeswamy and Morris, 1997b, Thippeswamy and Morris,

1997a), normalmente transportado en forma retrógrada desde los tejidos inervados (McMahon and Priestley, 1995, Boucher and McMahon, 2001). La disminución en la expresión de la enzima observada a partir del día 28 post lesión podría deberse a la producción local de factores tróficos por parte de las células gliales satelitales. Estas células producen diversos factores en respuesta a la injuria (Hammarberg et al., 1996, Lee et al., 1998, Zhou et al., 1999), contribuyendo a la supervivencia de las neuronas lesionadas. Por otra parte, se ha demostrado que el NO producido por las neuronas aferentes primarias actúa sobre las células gliales cercanas, activándolas (Meller and Gebhart, 1993). De esta forma, el NO podría estar limitando su propia producción mediante un complejo sistema regulatorio.

Nuestros resultados muestran que el aumento en la expresión de la nNOS se relaciona con una mayor producción de NO, como lo denotan los elevados niveles de óxidos de nitrógeno detectados en los ganglios y en la médula espinal lumbar luego de la injuria. La evolución temporal de la concentración de nitritos y nitratos es similar a la observada en la inmunoreactividad de la enzima, sugiriendo que la inducción de la síntesis de nNOS resulta en una proteína funcional que se encuentra activa. La disminución en la concentración de óxidos de nitrógeno detectada los días 35 y 42 post injuria se acompaña de una reducción en la inmunoreactividad de la enzima, por lo que la menor producción de NO probablemente se deba a una disminución en los niveles de la enzima y no en su actividad.

Aún no se ha dilucidado el significado fisiológico / patológico de este incremento en la producción de NO. Como ya se mencionó en la Introducción, se la han

atribuido a este mensajero gaseoso acciones tanto pro (Coderre and Yashpal, 1994) como antinociceptivas (Thippeswamy et al., 2001a, Thippeswamy et al., 2001b). El hecho de que la nNOS se exprese en diferentes tipos celulares del asta dorsal, incluyendo neuronas excitatorias (Kawamata and Omote, 1999) e interneuronas inhibitorias (Valtschanoff et al., 1992b), podría explicar esta discrepancia de roles. Por otra parte, se ha demostrado que el NO modifica lípidos de membrana (Kanner et al., 1992), proteínas (Moriguchi et al., 1992), y también el proceso de duplicación del ADN (Lepoivre et al., 1991), ejerciendo sus efectos a través de una amplia variedad de blancos celulares incluyendo canales iónicos, receptores, enzimas (Lepoivre et al., 1991, Kanner et al., 1992) y factores de transcripción (Fiallos Estrada et al., 1993), abriendo la posibilidad de obtener una gran diversidad de respuestas frente a este mensajero gaseoso.

Proyecto 4: Rol de las CEMO en modelos animales de dolor neuropático

Los resultados obtenidos en el marco del presente proyecto muestran la participación activa de las CEMO en un modelo animal de dolor neuropático, con migración a los ganglios afectados por la injuria periférica (Coronel et al., 2006), prevención del desarrollo de alodinia mecánica y térmica (Musolino et al., 2007) y modificación de los niveles de expresión de neuropéptidos y neuromoduladores (Coronel et al., 2007b).

Luego de ser inyectadas en los ganglios L4 ipsilaterales a la injuria periférica, las CEMO adquirieron una llamativa localización perineuronal, similar a la de las células gliales ganglionares. Esta localización pareciera depender de, al menos, tres factores: el tiempo transcurrido luego de la cirugía, el tipo de célula inyectada y la presencia de una injuria neural. La particular disposición de las CEMO fue adquirida como parte de un proceso activo, tiempo-dependiente, ya que no se observó en animales sacrificados inmediatamente después de realizar la inyección intraganglionar. Por otra parte, la ubicación perineuronal fue propia / exclusiva de las CEMO, ya que otra fracción de células obtenidas a partir de la médula ósea (CMN-H) se distribuyó heterogéneamente en el ganglio inyectado. Finalmente, la distribución de las CEMO fue al azar, heterogénea, en los ganglios no afectados por una lesión periférica, mostrando que únicamente las neuronas cuyos axones fueron dañados producen señales que atraen a las CEMO, orientando su disposición. Estas observaciones son sumamente interesantes ya que sugieren que las CEMO estarían desarrollando una función específica en los ganglios afectados por una injuria periférica.

Las CEMO migraron desde su sitio de inyección en el ganglio L4 exclusivamente hacia los otros ganglios lumbares afectados por la CUNP del nervio ciático, mostrando que estas células tienen un especial tropismo por los tejidos lesionados. La implantación de las CEMO ocurrió preferentemente en los ganglios L4 y L5 que son los que alojan a la mayoría de las neuronas aferentes primarias que originan el nervio ciático, y en una menor proporción en los ganglios L3 y L6. Esta migración de las CEMO pudo haber ocurrido tanto por vía vascular, como a través del líquido cefalorraquídeo, y probablemente haya sido mediada por quemoquinas, receptores de superficie y moléculas de adhesión expresadas en los ganglios raquídeos en respuesta a la injuria.

De hecho, nuestros experimentos muestran que luego de la injuria periférica se indujo la expresión del factor quimiotáctico MCP-1 α en las neuronas pequeñas y medianas de los GARDs. También observamos un incremento en la expresión de otro factor quemoatractante, el SDF-1, en las células gliales. De este modo, la lesión tisular induce la creación del microambiente adecuado para permitir el reclutamiento y la implantación de las CEMO circulantes. Estos resultados están en línea con datos de otros laboratorios que reportan un incremento en la expresión del SDF-1 en las células de Schwann del extremo distal del nervio ciático lesionado (Gleichmann et al., 2000), y un aumento en la inmunoreactividad para el MCP-1 α luego de una compresión directa del ganglio raquídeo (White et al., 2005). Se ha demostrado que ambos factores quimiotácticos participan en la migración de las CEMO, tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang et al., 2002b, Wang et al., 2002c, Ji et al., 2004). De hecho, las CEMO expresan los receptores del MCP-1 α y del SDF-1, las proteínas de superficie CXCR4 y CCR2 (Ji et al., 2004). Ambos factores

podrían estar mediando en la implantación de las CEMO en los ganglios lesionados.

Sin embargo no podemos descartar la participación de otros mediadores. En los ganglios lumbares, la expresión de ciertas moléculas de adhesión como TAG-1 (*Transient Axonal Glycoprotein 1*) (Soares et al., 2005), gicerina (Hiroi et al., 2003) y N-cadherina (Itoh et al., 1997) también se modifica luego de una lesión del nervio periférico. Por otra parte, las CEMO expresan una gran variedad de moléculas de superficie, entre ellas integrinas y moléculas de adhesión (Conget and Minguell, 1999), que podrían estar contribuyendo a su implantación en los GARDs

La migración e implantación selectiva de las CEMO en los ganglios lumbares afectados por la lesión periférica sugiere que estas células estarían cumpliendo una función específica luego de la injuria. De hecho, nuestros experimentos muestran que la administración de CEMO logró prevenir el desarrollo de alodinia mecánica y redujo significativamente el número de respuestas alodínicas frente a estímulos fríos en animales con una CUNP moderada de su nervio ciático. Estos efectos no se observaron luego de la administración de PBS ó CMN-H, indicando que la capacidad de atenuar el dolor es una propiedad inherente a las CEMO, y que no se debe a factores inespecíficos como la disrupción mecánica o alteraciones patológicas desencadenadas en las neuronas aferentes primarias como consecuencia de la inyección intraganglionar.

Nuestros experimentos muestran que las CEMO modificaron incluso el fenotipo de las neuronas aferentes primarias luego de la lesión periférica. Se detectó una reducción del 30% en el número de neuronas NPY-IR al comparar los animales tratados con CEMO

con aquellos que recibieron la inyección de PBS. El mismo efecto se observó al analizar la inmunoreactividad de galanina. Por el contrario, la administración de CEMO indujo un incremento aún mayor en la expresión de la enzima nNOS. Queda por demostrar si este incremento en la inmunoreactividad de la enzima se relaciona con una mayor producción y liberación de NO. El efecto de las CEMO sobre la expresión del receptor Y_1 fue aún más marcado, logrando prevenir la disminución en el número de perfiles neuronales Y_1 -IR que se produce como consecuencia de la injuria. El mantenimiento de los niveles normales de expresión del receptor Y_1 podría explicar, al menos en parte, los efectos analgésicos inducidos por las CEMO.

La migración, la implantación y los efectos protectores de las CEMO también se han demostrado en otros modelos animales de disfunción o injuria nerviosa como el infarto (Savitz et al., 2004), la isquemia (Chen et al., 2001) y el trauma (Lu et al., 2001a, Lu et al., 2001b) cerebral, la enfermedad de Parkinson (Lu et al., 2005) y la contusión (Chopp et al., 2000, Ohta et al., 2004, Zurita and Vaquero, 2004) y los procesos desmielinizantes (Bonilla et al., 2005) de la médula espinal. Algunos autores han reportado que las CEMO trasplantadas comienzan a expresar marcadores neuronales y astrocíticos (Lu et al., 2001b, Bonilla et al., 2005). Sin embargo, en nuestro modelo de dolor neuropático no hemos detectado la expresión de marcadores neurales, neuronales o gliales en las CEMO implantadas en los ganglios raquídeos.

La particular localización que adquieren las CEMO en nuestro modelo de dolor neuropático sugiere que las mismas tendrían una función similar a la de las células de la glia en un ganglio lesionado: producir factores tróficos que promuevan la

sobrevida de las neuronas sensitivas. Uno de los factores con propiedades tróficas sobre las neuronas aferentes primarias es el NGF (McMahon and Priestley, 1995, Boucher and McMahon, 2001). Este factor de crecimiento actúa a través de la activación de dos tipos de receptores, uno de baja afinidad, el p_{75} (Johnson et al., 1986), y otro de alta afinidad, el receptor Trk_A (Martin-Zanca et al., 1989). Ambos receptores se encuentran expresados en las neuronas aferentes primarias (Verge et al., 1992b). Nuestros experimentos muestran un aumento en los niveles de la forma fosforilada, activa, del receptor Trk_A en los ganglios raquídeos de animales con CUNP moderada e inyección intraganglionar de CEMO, indicando una mayor actividad de la vía de señalización del NGF. Estos resultados podrían indicar una mayor producción local de NGF, ya sea por las propias CEMO, o más probablemente por las células gliales ganglionares, inducidas por las CEMO. De hecho, se ha mostrado un incremento en la producción de NGF y BDNF luego de la administración de CEMO a animales con injuria cerebral (Mahmood et al., 2004) o medular traumática (Neuhuber et al., 2005). Finalmente, es importante considerar que las CEMO constitutivamente secretan un amplio espectro de citoquinas y factores de crecimiento que, en su ambiente natural, la médula ósea, modulan la sobrevida, la proliferación y la diferenciación de las CMH y su progenie (Eaves et al., 1991, Majumdar et al., 2000), y que, en los ganglios raquídeos, podrían estar modulando el comportamiento de las neuronas aferentes primarias frente a la injuria, modificando su fenotipo e influyendo de esta forma en la conducta nociceptiva de los animales.

Proyecto 5: Efecto de la administración del ODN IMT504 a animales con una compresión mecánica aguda de su nervio ciático

Los resultados aquí presentados muestran que la administración del ODN IMT504 logró prevenir el desarrollo de alodinia mecánica y redujo significativamente el número de respuestas dolorosas frente a estímulos fríos en animales con una lesión mecánica aguda de su nervio ciático.

Como ya se mencionó en la Introducción, este ODN tiene la capacidad de inducir la movilización y la proliferación de las CMM (Hernando Insúa et al., 2007). Nuestra hipótesis de trabajo planteaba que la movilización de las CMM endógenas hacia la circulación periférica resultaría en su implantación en los tejidos afectados por la injuria nerviosa. Sin embargo, no logramos detectar la presencia de marcadores de CMM en los nervios o en los ganglios raquídeos lumbares, sugiriendo la ausencia de dichas células en estos tejidos. De todas formas, no podemos descartar que la supuesta ausencia de CMM en los tejidos lesionados se deba a limitaciones de la metodología empleada, por lo que este punto debería ser evaluado utilizando otro acercamiento experimental.

Nuestros resultados muestran que los animales tratados con IMT504 o CEMO presentaron un comportamiento similar al ser evaluados en su conducta nociceptiva, sugiriendo que el efecto observado luego de la administración del ODN podría estar mediado por las CEMO. El efecto antinociceptivo observado luego de la administración de las CEMO está en línea con los resultados presentados en el Proyecto 4 de esta Tesis, contando este nuevo modelo experimental con la ventaja adicional de la

administración de las células por vía intravascular. No hemos estudiado aún el destino de las CEMO luego de su administración intravascular, ni los posibles mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo observado en animales con CMA, pero sin dudas resultaría interesante poder hacerlo.

Por otra parte, este trabajo nos ha permitido caracterizar los cambios en la expresión de los neuropéptidos NPY y galanina, el receptor Y_1 de NPY y la enzima nNOS en las neuronas aferentes primarias luego de una lesión mecánica aguda del nervio ciático. Nuestros resultados muestran que los cambios fenotípicos inducidos por la CMA son similares a los observados luego de otros tipos de lesión del nervio ciático como la administración de colchicina (Proyecto 1), la compresión crónica (Proyectos 2 y 4) y la axotomía (Proyecto 3), aunque de menor magnitud y duración en el tiempo, probablemente debido a que se trata de una lesión de menor severidad. La recuperación de los niveles normales de expresión de neuropéptidos y neuromoduladores coincide con la normalización de la respuesta de los animales frente a estímulos mecánicos y térmicos. Esta pronta normalización de la conducta nociceptiva de los animales estaría también relacionada con la menor severidad de la lesión.

La administración de IMT504 no indujo cambios adicionales en el fenotipo de las neuronas aferentes primarias, sugiriendo que los cuatro marcadores evaluados no estarían involucrados en los efectos antinociceptivos observados luego de la administración del ODN.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que el IMT504 no solo previene la generación de alodinia mecánica y térmica cuando es administrado en forma simultánea a la realización de la injuria periférica, sino que también logra revertir la disminución en el umbral de respuesta frente a estímulos mecánicos y térmicos al ser administrado 4 días después de inducida la lesión. Estos resultados son muy interesantes ya que muestran la factibilidad de realizar un tratamiento diferido en el tiempo. Sin embargo, y por tratarse de un trabajo en curso, no contamos aún con los datos necesarios para confirmar los mecanismos de acción involucrados. Probablemente deban tenerse en cuenta también las propiedades inmunomoduladoras de este ODN.

Conclusiones generales

El dolor neuropático es una patología crónica, severa e incapacitante con alta incidencia en la población. Su etiología es muy variada y los mecanismos fisiopatológicos involucrados son complejos y, en gran parte, aún desconocidos. Los tratamientos actualmente disponibles carecen de la eficacia deseada y poseen numerosos efectos adversos que a menudo impiden su utilización.

Los experimentos incluidos en esta Tesis fueron diseñados con el fin de caracterizar los cambios neuroquímicos que ocurren en las neuronas aferentes primarias, primera estación en las vías de conducción del dolor, luego de una injuria del nervio periférico. Nuestros resultados muestran que diferentes tipos de lesión del nervio ciático desencadenan un importante incremento en la expresión de los neuropéptidos NPY y galanina, así como un aumento en la producción del neuromodulador gaseoso óxido nítrico en los ganglios raquídeos y en la médula espinal lumbar. Estos resultados han mostrado el alto grado de plasticidad de las neuronas aferentes primarias y han permitido profundizar en el conocimiento de ciertos mediadores involucrados en la generación, el mantenimiento y la atenuación del dolor neuropático.

También se presentan datos originales sobre el efecto de la administración de terapias celulares y moleculares a animales con lesiones del nervio ciático. Nuestros resultados muestran la capacidad de las células estromales de médula ósea de migrar e implantarse en los ganglios raquídeos afectados por la injuria, modificando la expresión de neuropéptidos y neuromoduladores en las neuronas aferentes primarias, y previniendo el desarrollo de conductas asociadas al dolor neuropático, como la alodinia mecánica y la alodinia térmica. Finalmente se muestra que la administración del oligonucleótido

IMT504 también logra prevenir ambas alteraciones nociceptivas.

Todos estos resultados fueron obtenidos a partir de estudios realizados en animales de experimentación y por lo tanto son sólo un indicio de la ocurrencia de procesos similares en el hombre. Sin embargo, teniendo en cuenta la falta de terapias efectivas y bien toleradas para el tratamiento de los pacientes que padecen dolor neuropático, nuestros hallazgos son sumamente interesantes ya que muestran la eficacia de las CEMO y del IMT504 como agentes que permiten disminuir el dolor. Se requieren nuevos estudios que permitan caracterizar exhaustivamente la participación de estos moduladores celulares y moleculares en el procesamiento de la información nociceptiva.

Bibliografía

- Abdi, S., Lee, D. H., Chung, J. M., 1998. The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analog* 87, 1360-1366.
- Abdulla, F. A., Smith, P. A., 1999. Nerve injury increases an excitatory action of neuropeptide Y and Y2-agonists on dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 89, 43-60.
- Abouelfetouh, A., Kondoh, T., Ehara, K., Kohmura, E., 2004. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. *Brain Res* 1029, 114-119.
- Abrams, J., 1996. Beneficial actions of nitrates in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 77, 31-37.
- Agrawal, S., Kandimalla, E. R., 2001. Antisense and/or immunostimulatory oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 1, 197-209.
- Ahlgren, S. C., Levine, J. D., 1993. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* 52, 1049-1055.
- Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S. R., Kimura, H., 1991. Localization of NADPH diaphorase-containing neurons in sensory ganglia in the rat. *J Comp Neurol* 306, 382-392.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615.
- Ali, Z., Ringkamp, M., Hartke, T. V., Chien, H. F., Flavahan, N. A., Campbell, J. N., Meyer, R. A., 1999. Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. *J Neurophysiol* 81, 455-466.
- Allen, Y. S., Adrian, T. E., Allen, J. M., Tatemoto, K., Crow, T. J., Bloom, S. R., Polak, J. M., 1983. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221, 877-879.
- Alston, R. P., Pechon, P., 2005. Dysesthesia associated with sternotomy for heart surgery. *Br J Anaesth* 95, 153-158.
- Andersen, G., Vestergaard, K., Ingeman-Nielsen, M., Jensen, T. S., 1995. Incidence of central post-stroke pain. *Pain* 61, 187-193.
- Andrew, P. J., Mayer, B., 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521-531.
- Aquino, J. B., Musolino, P. L., Coronel, M. F., Villar, M. J., Setton-Avruj, C. P., 2006. Nerve degeneration is prevented by a single intraneural apotransferrin injection into colchicine injured sciatic nerves in the rat. *Brain Res* 117, 80-91.
- Authier, N., Coudore, F., Eschalier, A., Fialip, J., 1999. Pain related behaviour during vincristine-induced neuropathy in rats. *NeuroReport* 6, 965-968.
- Authier, N., Gillet, J. P., Fialip, J., Eschalier, A., Coudore, F., 2003. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Exp Neurol* 182,

12-20.

- Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C., Prockop, D. J., 1998. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats: similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3908-3913.
- Ballas, Z. K., Krieg, A. M., Warren, T., Rasmussen, W., Davis, H. L., Waldschmidt, M., Weiner, G. J., 2001. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 167, 4878-4886.
- Baringa, M., 1991. Is nitric oxide the "retrograde messenger"? *Science* 254, 1296-1297.
- Baron, R., 2006. Mechanisms of disease: neuropathic pain - a clinical perspective. *Nature Clinical Practice - Neurology* 2, 95-106.
- Basbaum, A. I., Bushnell, M., 2002. Pain: basic mechanisms. In: *Pain 2002 - an updated review*. M. Giambardino (Ed.), IASP Press, Seattle, USA.
- Basbaum, A. I., Fields, H. L., 1984. Endogenous pain control systems: brain stem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7, 309-338.
- Bennett, G., Seltzer, Z., Lu, G., Nishikawa, N., Dubner, R., 1983. The cells of origin of the dorsal column postsynaptic projection in the lumbosacral enlargements of cats and monkeys. *Somatosens Res* 1, 131-149.
- Bennett, G., Xie, Y. K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Berger, A., Dukes, E. M., Oster, G., 2004. Clinical characteristics and economic costs of patients with painful neuropathic disorders. *J Pain* 5, 143-149.
- Bertaso, F., Ward, R. J., Viard, P., Milligan, G., Dolphin, A. C., 2003. Mechanism of action of Gq to inhibit G beta gamma modulation of Cav2.2 calcium channels: proved by the use of receptor G alpha tandems. *Mol Pharmacol* 63, 832-843.
- Biernaskie, J., Sparling, J. S., Liu, J., Shannon, C. P., Plemel, J. R., Xie, Y., Miller, F. D., Tetzlaff, W., 2007. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27, 9545-9559.
- Blanco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P. G., 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-192.
- Bleakman, D., Alt, A., Nisenbaum, E. S., 2006. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol* 17, 592-604.
- Blondheim, N. R., Levy, Y. S., Ben-Zur, T., Burshtein, A., Cherlow, T., Kan, I., Barzilai, R., Bahat-Stromza, M., Barhum, Y., Bulvik, S., Melamed, E., Offen, D., 2006. Human

- mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev* 15, 141-164.
- Blumberg, H., Janig, W., 1984. Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma. *Pain* 20, 335-353.
- Boggs, R. T., McGraw, K., Condon, T., Flournoy, S., Villiet, P., Bennett, C. F., Monia, B. P., 1997. Characterization and modulation of immune stimulation by modified oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 461-471.
- Boivie, J., 1999. Central pain. *Textbook of Pain*. Wall, P.D., Melzack, R. (Eds) Edimburgh: Churchill Livingstone, 879-914.
- Bonilla, S., Silva, A., Valdes, L., Geijo, E., Garcia-Verdugo, J. M., Martinez, S., 2005. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. *Neuroscience* 133, 85-95.
- Boucher, T. J., McMahon, S. B., 2001. Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 1, 66-72.
- Boureau, F., Doubrere, J. F., Luu, M., 1990. Study of verbal description in neuropathic pain. *Pain* 42, 145-152.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braman, R. S., Hendrix, S. A., 1989. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescent detection. *Analytical Chemistry* 61, 2715-2718.
- Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., Walker, M. W., 2000. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21, 109-116.
- Branchek, T. A., Smith, K. E., Walker, M. W., 1998. Molecular biology and pharmacology of galanin receptors. *Ann NY Acad Sci* 863, 94-107.
- Branda, R. F., Moore, A. L., Lafayette, A. R., Mathews, L., Hong, R., Zon, G., Brown, T., McCormack, J. J., 1996. Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Lab Clin Med* 128, 329-338.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Snyder, S. H., 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H., 1990. Isolation of nitric oxide synthase. A calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 682-685.
- Brenman, J. E., Xia, H. H., Chao, D. S., Black, S. M., Bredt, D. S., 1997. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neurosci* 19, 224-231.
- Broholm, H., Rubin, I., Kruse, A., Braendstrup, O., Schmidt, K., Skriver, E. B., Lauritzen, M.,

2003. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. *Clin Neuropathol* 22, 273-281.
- Brumovsky, P., Hofstetter, C., Olson, L., Ohning, G., Villar, M., Hökfelt, T., 2006a. The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord. *Neuroscience* 138, 1361-1376.
- Brumovsky, P., Hygge-Blakeman, K., Villar, M. J., Watanabe, M., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., 2006b. Phenotyping of sensory and sympathetic ganglion neurons of a galanin-overexpressing mouse--possible implications for pain processing. *J Chem Neuroanat* 31, 243-262.
- Brumovsky, P., Mennicken, F., O'Donnell, D., Hökfelt, T., 2006c. Differential distribution and regulation of galanin receptors -1 and -2 in the rat lumbar spinal cord. *Brain Res* 1085, 111-120.
- Brumovsky, P., Shi, T. J., Landry, M., Villar, M. J., Hökfelt, T., 2007. Neuropeptide tyrosine and pain. *Trends Pharmacol Sci* 28, 93-102.
- Brumovsky, P., Stanic, D., Shuster, S., Herzog, H., Villar, M., Hökfelt, T., 2005. Neuropeptide Y2 receptor protein is present in peptidergic and nonpeptidergic primary sensory neurons of the mouse. *J Comp Neurol* 489, 328-348.
- Brumovsky, P. R., Bergman, E., Liu, H., Hökfelt, T., Villar, M. J., 2004. 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. *Brain Res* 1006, 87-99.
- Brumovsky, P. R., Shi, T. J., Matsuda, H., Kopp, J., Villar, M. J., Hökfelt, T., 2002. NPY Y1 receptors are present in axonal processes of DRG neurons. *Exp Neurol* 174, 1-10.
- Burgess, P., Perl, E., 1967. Myelinated afferent fibers responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* 190, 541-562.
- Cabezas-Cerrato, J., 1998. The prevalence of clinical diabetic peripheral polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). Diabetologia* 41, 1263-1269.
- Campbell, J. N., Meyer, R. A., 2006. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52, 77-92.
- Cervero, F., 1995. What is a nociceptor-specific (class 3) cell? *Pain* 62, 123-124.
- Ch'ng, J. L. C., Christofides, N. D., Anand, P., Gibson, S. J., Allen, Y. S., Su, H. C., Tatemoto, K., Morrison, J. F. B., Polak, J. M., Bloom, S. R., 1985. Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and responses of galanin-containing neuronal pathways to injury. *Neuroscience* 16, 343-354.
- Chang, V. T., Janjan, N., Jain, S., Chau, C., 2006. Update in cancer pain syndromes. *J Palliat Med*

9, 1414-1434.

- Chaplan, S., Bach, F., Pogrel, J., Chung, J., Yaksh, T., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci* 16, 7711-7724.
- Chen, C. J., Ou, Y. C., Liao, S. L., Chen, W. Y., Chen, S. Y., Wu, C. W., Wang, C. C., Wang, W. Y., Huang, Y. S., Hsu, S. H., 2007. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol* 204, 443-453.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., Chopp, M., 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32, 1005-1011.
- Chernousov, M. A., Carey, D. J., 2000. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol* 15, 593-601.
- Choi, Y., Yoon, Y. W., Na, H. S., Kim, S. H., Chung, J. M., 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59, 369-376.
- Chopp, M., Zhang, X. H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., Lu, M., Rosenblum, M., 2000. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 11, 3001-3005.
- Chronwall, B. M., DiMaggio, D. A., Massari, V. J., Pickel, V. M., Ruggiero, D. A., O'Donohue, D. M., 1985. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15, 1159-1181.
- Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billar, T. R., Kim, Y. M., 2001. Breakthroughs and views of nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1075-1079.
- Coderre, T. J., Yashpal, K., 1994. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur J Neurosci* 6, 1328-1334.
- Colmers, W. F., Bleakman, D., 1994. Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci* 17, 373-379.
- Coluzzi, F., Mattia, C., 2005. Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain: the role of antidepressants. *Curr Pharm Des* 11, 2945-2960.
- Colvin, L. A., Duggan, A. W., 1998. Primary afferent-evoked release of immunoreactive galanin in the spinal cord of the neuropathic rat. *Br J Anaesth* 81, 436-443.
- Colvin, L. A., Mark, M. A., Duggan, A. W., 1997. The effect of peripheral mononeuropathy on immunoreactive (-ir)-galanin release in the spinal cord of the rat. *Brain Res* 766, 259-261.
- Conget, P. A., Minguell, J. J., 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow

- mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181, 67-73.
- Coronel, M. F., Brumovsky, P. R., Hökfelt, T., Villar, M. J., 2007a. Differential galanin upregulation in dorsal root ganglia and spinal cord after graded single ligature nerve constriction of the rat sciatic nerve. *J Chem Neuroanat* (in press).
- Coronel, M. F., Defagot, M. C., Musolino, P. L., Villar, M. J., 2005. Nitric oxide production in rat dorsal root ganglia and spinal cord after sciatic nerve lesion. *J Neurop Pain Symptom Pall* 1, 3-9.
- Coronel, M. F., Musolino, P. L., Brumovsky, P. R., Hökfelt, T., Villar, M. J., 2007b. Bone marrow stromal cells induce changes in NPY, galanin and Y1 receptor expression after sciatic nerve constriction. *Neuropeptides* (under revision).
- Coronel, M. F., Musolino, P. L., Villar, M. J., 2006. Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett* 405, 5-9.
- Corwin, H. M., 2006. Compression neuropathies of the upper extremity. *Clin Occup Environ Med* 5, 333-352.
- Costigan, M., Befort, K., Karchewski, L., Griffin, R. S., D'Urso, D., Allchorne, A., Sitarski, J., Mannion, J. W., Pratt, R. E., Woolf, C. J., 2002. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci* 3, 16.
- Cova, L., Ratti, A., Volta, M., Fogh, I., Cardin, V., Corbo, M., Silani, V., 2004. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: the issue of transdifferentiation. *Stem Cells Dev* 13, 121-131.
- Cridland, R. A., Henry, J. L., 1988. Effects of intrathecal administration of neuropeptides on a spinal nociceptive reflex in the rat: VIP, galanin, CGRP, TRH, somatostatin and angiotensin II. *Neuropeptides* 11, 23-32.
- Cristino, L., Pica, A., Della Corte, F., Bentivoglio, M., 2000. Coinduction of nitric oxide synthase, BCL-2 and growth associated protein 43 in spinal motoneurons during axon regeneration in the lizard tail. *Neuroscience* 101, 451-458.
- Crum, C., Johnson, J. D., Nelson, A., Roth, D., 1988. Complementary oligodeoxynucleotide mediated inhibition of tobacco mosaic virus RNA translation in vitro. *Nucleic Acids Res* 16, 4569-4581.
- Cuevas, P., Carceller, F., Dujovny, M., Garcia-Gomez, I., Cuevas, B., González-Corrochano, R., Diaz-González, D., Reimers, D., 2002. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 24, 634-638.

- Cuevas, P., Carceller, F., García Gomez, I., Yan, M., Dujovny, M., 2004. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res* 26, 230-232.
- Davies, P. S., Galer, B. S., 2004. Review of lidocaine patch 5% studies in the treatment of postherpetic neuralgia. *Drugs* 64, 937-947.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L., 1995. Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 34, 323-342.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L., Snyder, S. H., 1992. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32, 297-311.
- de Quidt, M. E., Emson, P. C., 1986a. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--I. Radioimmunoassay and chromatographic characterization. *Neuroscience* 18, 527-543.
- de Quidt, M. E., Emson, P. C., 1986b. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 18, 545-618.
- Devor, M., 2006. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 7, 3-12.
- Devor, M., Govrin-Lippmann, R., Angelides, K., 1993. Na⁺ channel immunolocalization in peripheral mammalian axons and changes following nerve injury and neuroma formation. *J Neurosci* 13, 1976-1992.
- Dickinson, T., Fleetwood-Walker, S. M., 1999. VIP and PACAP: very important in pain? *Trends Pharmacol Sci* 20, 324-329.
- DiStefano, P. S., Friedman, B., Radziejewski, C., Alexander, C., Boland, P., Schick, C. M., Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8, 983-993.
- Djoughri, L., Koutsikou, S., Fang, X., McMullan, S., Lawson, S. N., 2006. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci* 26, 1281-1292.
- Du, Z. W., Zhang, S. C., 2004. Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem Cells Dev* 13, 372-381.
- Dubner, R., Kenshalo, D., Maixner, W., Bushnell, M., Oliveras, J., 1989. The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. *J Neurophysiol* 62, 450-457.
- Dworkin, R. H., 2002. An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. *Clin J Pain* 18, 343-349.
- Dyck, P. J., Dyck, P. J., Larson, T. S., O'Brien, P. C., Velosa, J. A., 2000. Patterns of quantitative

- sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve growth factor study group. *Diabetes Care* 23, 510-517.
- Eaves, C. J., Cashman, J. D., Kay, R. J., Dougherty, G. J., Otsuka, T., Gaboury, L. A., Hogge, D. E., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., Humphries, R. K., 1991. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood* 78, 110-117.
- Edlich, R. F., Winters, K. L., Britt, L., Long, W. B., 2006. Trigeminal neuralgia. *J Long Term Eff Med Implants* 16, 185-192.
- Eglitis, M. A., Mezey, E., 1997. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4080-4085.
- Eisenberg, E., River, Y., Shifrin, A., Krivoy, N., 2007. Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. *Drugs* 67, 1265-1289.
- Elías, F., Fló, J., López, R. A., Zorzopulos, J., Montaner, A., Rodríguez, J. M., 2003. Strong cytosine-guanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT motifs. *J Immunol* 171, 3697-3704.
- Elías, F., Fló, J., Rodríguez, J. M., De Nichilo, A., López, R. A., Zorzopulos, J., Nagle, C., Lahoz, M., Montaner, A., 2005. PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant Hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response. *Vaccine* 23, 3597-3603.
- Elías, W. J., Burchiel, K. J., 2002. Trigeminal neuralgia and other neuropathic pain syndromes of the head and face. *Curr Pain Headache Rep* 6, 115-124.
- Eliav, E., Herzberg, U., Ruda, M. A., Bennett, G. J., 1999. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain* 83, 169-182.
- England, J. D., 1999. Entrapment neuropathies. *Curr Opin Neurol* 12, 597-602.
- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., Persson, H., 1990. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5, 511-526.
- Eva, C., Serra, M., Mele, P., Panzica, G., Oberto, A., 2006. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y(1) receptor. *Front Neuroendocrinol* 27, 308-339.
- Facer, P., Casula, M. A., Smith, G. D., Benham, C. D., Chessell, I. P., Bountra, C., Sinisi, M., Birch, R., Anand, P., 2007. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes

- in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurology* 7, 11-23.
- Fiallos Estrada, E. C., Kummer, W., Mayer, B., Bravo, R., Zimmerman, M., Herdegen, T., 1993. Long lasting increase of in nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH diaphorase reaction and c-JUN coexpression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neurosci Lett* 150, 169-173.
- Fields, T. A., Casey, P. J., 1997. Signalling functions and biochemical properties of pertussin toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 321, 561-571.
- Fiscus, R. R., 1988. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. *Semin Thromb Hemost* 14, 12-22.
- Fitzgerald, M., Wall, P. D., Goedert, M., Emson, P. C., 1985. Nerve growth factor counteracts the neurophysiological and neurochemical effects of chronic sciatic nerve section. *Brain Res* 332, 131-141.
- Forstermann, U., Gorsky, L. D., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M., Murad, F., 1990. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 727-732.
- Frau, G., Bergamasco, G., 1962. The use of intravenous nitroglycerin in the therapy of coronary disease. Preliminary results. *Cardiologia* 40, 252-258.
- Freyenhagen, R., Rolke, R., Baron, R., Tolle, T. R., Rutjes, A. K., Schu, S., Treede, R. D., 2007. Pseudoradicular and radicular low-back pain - A disease continuum rather than different entities? Answers from quantitative sensory testing. *Pain* (in press).
- Fu, S. Y., Gordon, T., 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14, 67-116.
- Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V., Jothianandan, D., 1984. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6, 336-343.
- Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Galluzi, K. E., 2005. Management of neuropathic pain. *JAOA* 105, 12-19.
- Gally, J. A., Montague, P. R., Reeke, G. N., Edelman, G. M., 1990. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapid diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3547-3551.
- Gammaitoni, A. R., Alvarez, N. A., Galer, B. S., 2003. Safety and tolerability of the lidocaine patch 5%, a targeted peripheral analgesic: a review of the literature. *J Clin Pharmacol* 43, 111-117.
- Garthwaite, J., Charles, S. L., Chess-Williams, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor

- release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385-388.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R. M., Moncada, S., 1989a. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172, 413-416.
- Garthwaite, J., Southam, E., Anderton, M., 1989b. A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem* 53, 1952-1954.
- Gibbs, J. L., Diogenes, A., Hargreaves, K. M., 2007. Neuropeptide Y modulates effects of bradykinin and prostaglandin E₂ on trigeminal nociceptors via activation of the Y₁ and Y₂ receptors. *Br J Pharmacol* 150, 72-79.
- Gibbs, J. L., Flores, C. M., Hargreaves, K. M., 2004. Neuropeptide Y inhibits capsaicin-sensitive nociceptors via a Y1-receptor mediated mechanism. *Neuroscience* 125, 703-704.
- Gibson, J., Polak, J. M., Allen, J. M., Adrian, T. E., Kelly, J. S., Bloom, S. R., 1984. The distribution and origin of a novel brain peptide, neuropeptide Y, in the spinal cord of several mammals. *J Comp Neurol* 227, 78-91.
- Gilron, I., Bailey, J. M., Tu, D., Holden, R. R., Weaver, D. F., Houlden, R. L., 2005. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *N Engl J Med* 352, 1324-1334.
- Gilron, I., Watson, C. P. N., Cahill, C. M., Moulin, D. E., 2006. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ* 175, 265-275.
- Ginn, S. R., Peterson, G. M., 1992. Studies related to the use of colchicine as a neurotoxin in the septohippocampal cholinergic system. *Brain Res* 590, 144-152.
- Gkaliagkousi, E., Ritter, J., Ferro, A., 2007. Platelet-derived nitric oxide signalling and regulation. *Circ Res* 101, 654-662.
- Gleichmann, M., Gillen, C., Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter, R., Auer, J., Muller, H. W., 2000. Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* 12, 1857-1866.
- Goodchild, J., Agrawal, S., Civeira, M. P., Sarin, P. S., Sun, D., Zamecnik, P. C., 1988. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5507-5511.
- Grouzmann, E., Meyer, C., Burki, E., Brunner, H., 2001. Neuropeptide Y Y2 receptor signalling mechanisms in the human glioblastoma cell line LN319. *Peptides* 22, 379-386.
- Gureje, O., Von Korff, M., Simon, G. E., Gater, R., 1998. Persistent pain and well-being: a World Health Organization Study in Primary Care. *JAMA* 280, 147-151.

- Gustafson, E. L., Smith, K. E., Durkin, M. M., Gerald, C., Branchek, T. A., 1996. Distribution of a rat galanin receptor mRNA in rat brain. *Neuroreport* 7, 953-957.
- Hall, S., 2001. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J Hand Surg Br* 26, 129-136.
- Hall, S., 2005. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br* 87, 1309-1319.
- Hammarberg, H., Piehl, F., Cullheim, S., Fjell, J., Hökfelt, T., Fried, K., 1996. GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuroreport* 7, 857-860.
- Hankinson, T. C., Klimo, P., Feldstein, N. A., Anderson, R. C., Brockmeyer, D., 2007. Chiari malformations, syringohydromyelia and scoliosis. *Neurosurg Clin N Am* 18, 594-568.
- Harden, N., Cohen, M., 2003. Unmet needs in the management of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 25, 12-17.
- Harris, M., Eatsman, R., Cowie, C., 1993. Symptoms of sensory neuropathy in adults with NIDDM in the US population. *Diabetes Care* 16, 1446-1452.
- Hartmann, G., Krieg, A. M., 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164, 944-950.
- Haythornthwaite, J. A., Benrud-Larson, L. M., 2001. Psychological assessment and treatment of patients with Neuropathic Pain. *Curr Pain Headache Rep* 5, 124-129.
- Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S. L., Pluznik, D. H., Watt, R., Neckers, L. M., 1987. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 5, 445-449.
- Hendry, S., Hsiao, S., Brushnell, M., 1999. Somatic sensation. In: *Fundamental Neuroscience*. M. Zigmond, F.E. Bloom, S. Landis, J. Roberts and L. Squire (Eds.), Academic Press, San Diego, USA.
- Heneka, M. T., Loschmann, P. A., Gleichmann, M., Weller, M., Schulz, J. B., Wullner, U., Klockgether, T., 1998. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem* 71, 88-94.
- Heredia, M. P., Delgado, C., Pereira, L., Perrier, R., Richard, S., Vassort, G., Benitah, J. P., Gomez, A. M., 2005. Neuropeptide Y rapidly enhances $[Ca^{2+}]_i$ transients and Ca^{2+} sparks in adult rat ventricular myocytes through the Y_1 receptor and PLC activation. *J Mol Cell Cardiol* 38, 205-212.
- Hernando Insúa, A., Montaner, A. D., Rodríguez, J. M., Elías, F., Fló, J., López, R. A., Zorzopulos, J., Hofer, E. L., Chasseing, N. A., 2007. IMT, the prototype of the immunostimulatory

- oligonucleotides of the PyNTTTTGT class, increases in the number of progenitors of mesenchymal stem cells both in vitro and in vivo: potential use in tissue repair therapy. *Stem Cells* 25, 1047-1054.
- Hernandorena, P. J., 1963. Experiences with the use of oral nitroglycerin in tablets of controlled drug liberation in the treatment of angina pectoris. *Sem Med* 123, 903-905.
- Hewitt, D. J., Mc Donald, M., Portenoy, R. K., Rosenfield, B., Passik, S., Breitbart, W., 1997. Pain syndromes and etiologies in ambulatory AIDS patients. *Pain* 70, 117-123.
- Hibbs, J. B., Vavrin, Z., Taintor, R. R., 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138, 550-565.
- Hiroi, S., Tsukamoto, Y., Sasaki, F., Miki, N., Taira, E., 2003. Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in development and regeneration of chick sciatic nerve. *FEBS Lett* 554, 311-314.
- Hökfelt, T., Brumovsky, P., Shi, T., Pedrazzini, T., Villar, M., 2007. NPY and pain as seen from the histochemical side. *Peptides* 28, 365-372.
- Hökfelt, T., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M., Melander, T., 1987. Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci Lett* 83, 217-220.
- Hökfelt, T., Zhang, X., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1994. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional applications. *TINS* 17, 22-30.
- Holets, V. R., Hökfelt, T., Rokaeus, A., Terenius, L., Goldstein, M., 1988. Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neuroscience* 24, 893-906.
- Holmes, F. E., Mahoney, S., Wynick, D., 2005. Use of genetically engineered transgenic mice to investigate the role of galanin in the peripheral nervous system after injury. *Neuropeptides* 39, 191-201.
- Hölscher, C., 1997. Nitric Oxide, the Enigmatic Neuronal Messenger: It's Role in Synaptic Plasticity. *Trends Neurosci* 20, 298-303.
- Hsu, S., Ranid, L., Fanger, H., 1981. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580.
- Hua, X. Y., Boublik, J. H., Spicer, M. A., Rivier, J. E., Brown, M. R., Yaksh, T. L., 1991. The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic

- studies on structure-activity relationship. *J Pharmacol Exp Ther* 258, 243-248.
- Hua, X. Y., Hayes, C. S., Hofer, A., Fitzsimmons, B., Kilk, K., Langel, U., Bartfai, T., Yaksh, T. L., 2004. Galanin acts at GalR1 receptors in spinal antinociception: synergy with morphine and AP-5. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 574-582.
- Huang, L. Y., Neher, E., 1996. Ca(2+)-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 17, 135-145.
- Ignarro, L., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., Byrns, R. E., 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8103-8107.
- Ignarro, L. J., 1989. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 3, 31-36.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 9265-9269.
- Iismaa, T. P., Shine, J., 1999. Galanin and galanin receptors. *Results Probl Cell Differ* 26, 257-291.
- Itoh, K., Ozaki, M., Stevens, B., Fields, R. D., 1997. Activity-dependent regulation of N-cadherin in DRG neurons: differential regulation of N-cadherin, NCAM, and L1 by distinct patterns of action potentials. *J Neurobiol* 33, 735-748.
- Jaeger, R., 1957. Causalgia, its etiology and treatment in traumatic conditions of the peripheral nerves and spinal cord. *Pa Med J* 60, 977-982.
- Jaskulski, D., deRiel, J. K., Mercer, W. E., Calabretta, B., Baserga, R., 1988. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 240, 1544-1546.
- Jensen, T. S., Baron, R., 2003. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Pain* 102, 1-8.
- Jensen, T. S., Gottrup, H., Sindrup, S. H., Bach, F. W., 2001. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429, 1-11.
- Ji, J. F., He, B. P., Dheen, S. T., Tay, S. S., 2004. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 22, 415-427.
- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., Woolf, C. J., 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26, 696-705.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz González, X. R., Reyes, M., Lenvick, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, W. A., Verfaillie, C. M., 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M., 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554.
- Ju, G., Hökfelt, T., Brodin, E., Fahrenkrug, J., Fischer, J. A., Frey, P., Elde, R. P., Brown, J. C., 1987. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res* 247, 417-431.
- Julius, D., Basbaum, A. I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- Kalso, E., 2005. Improving opioids effectiveness: from ideas to evidence. *Eur J Pain* 9, 131-135.
- Kalso, E., Mennander, S., Tasmuth, T., Nilsson, E., 2001. Chronic post-sternotomy pain. *Acta Anaesthesiol Scand* 45, 935-939.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R., 1992. Nitric oxide, and inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cicloxygenase and hemoglobin. *Lipids* 27, 46-49.
- Katsuki, S., Arnold, W., Murad, F., 1977. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucleotide Res* 3, 239-247.
- Katz, N. P., Gammaitoni, A. R., Davis, M. W., Dworkin, R. H., 2002. Lidocaine patch 5% reduces pain intensity and interference with quality of life in patients with postherpetic neuralgia: an effectiveness trial. *Pain Med* 3, 324-332.
- Kawamata, T., Omote, K., 1999. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/ cyclic-guanosine 3',5'-monophosphate/ glutamate release cascade in nociceptive signalling. *Anesthesiol* 91, 1415-1424.
- Kenner, M., Menon, U., Elliott, D. G., 2007. Multiple sclerosis as a painful disease. *Int Rev Neurobiol* 79, 303-321.
- Kerekes, N., Mennicken, F., O'Donnell, D., Hökfelt, T., Hill, R. H., 2003. Galanin increases membrane excitability and enhances Ca(2+) currents in adult, acutely dissociated dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 18, 2957-2966.
- Kerr, B. J., Cafferty, W. B., Gupta, Y. K., Bacon, A., Wynick, D., McMahon, S. B., Thompson, S. W., 2000. Galanin knockout mice reveal nociceptive deficits following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 12, 793-802.
- Kerr, B. J., Thompson, S. W. N., Wynick, D., McMahon, S. B., 1998. Galanin mutant mice are hypoalgesic in a partial nerve injury model. *SFN*, abstr. 24, 1391.
- Kim, S., Chung, J. M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355-363.

- Kingham, P. J., Kalbermatten, D. F., Mahay, D., Armstrong, S. J., Wiberg, M., Terenghi, G., 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 207, 267-274.
- Klein, C. M., Westlund, K. N., Coggeshall, R. E., 1990. Percentages of dorsal root axons immunoreactive for galanin are higher than those immunoreactive for calcitonin gene-related peptide in the rat. *Brain Res* 519, 97-101.
- Kline, J. N., Businga, T. J., Waldschmidt, M., Weinstock, J. V., Krieg, A. M., 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 15, 2555-2559.
- Kohno, T., Ji, R. R., Ito, N., Allchorne, A. J., Befort, K., Karchewski, L. A., Woolf, C. J., 2005. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 117, 77-87.
- Korsching, S., Thoenen, H., 1983. Quantitative demonstration of the retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. *Neurosci Lett* 39, 1-4.
- Krieg, A. M., 1999. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochem Biophys Acta* 1489, 107-116.
- Kruger, N. J., 1994. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32, 9-15.
- Kuenkel, V. H., 1952. Causalgia pathogenesis and treatment. *Calif Med* 77, 374-376.
- Kuraishi, Y., Kawabata, S., Matsumoto, T., Nakamura, A., Fujita, H., Satoh, M., 1991. Involvement of substance P in hyperalgesia induced by intrathecal galanin. *Pain* 44, 321-324.
- Landry, M., Bouali-Benazzous, R., André, C., Shi, T. J., Hökfelt, T., Nagy, F., 2004. Galanin-R1 receptor expression in a subpopulation of glutamatergic interneurons in the dorsal horn of the spinal cord. *FENS Forum*, abstr. A051.014.
- Landry, M., Holmberg, K., Zhang, X., Hökfelt, T., 2000. Effect of axotomy on expression of NPY, galanin, and NPY Y1 and Y2 receptors in dorsal root ganglia and the superior cervical ganglion studied with double-labeling in situ hybridization and immunohistochemistry. *Exp Neurol* 162, 361-384.
- Landry, M., Liu, H. X., Shi, T. J., Brumovsky, P., Nagy, F., Hökfelt, T., 2005. Galaninergic mechanisms at the spinal level: focus on histochemical phenotyping. *Neuropeptides* 39, 223-131.
- Lang, R., Gundlach, A. L., Kofler, B., 2007. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions and implications in health and disease. *Pharmacol Ther* 115, 177-207.

- Larhammar, D., Salaneck, E., 2004. Molecular evolution of NPY receptor subtypes. *Neuropeptides* 38, 141-151.
- Latarjet, M., Ruiz Liard, A., 1995. *Anatomía humana*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana.
- Lawson, S., 1992. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In: *Sensory neurons: diversity, development and plasticity*. S. Scott (Ed.), Oxford University Press, New York, USA.
- Lawson, S., 1996. Peptides and cutaneous polymodal nociceptor neurons. *Prog Brain Res* 113, 369-385.
- Lawson, S., 2002. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurons with C-, A δ - or A α / β -fibers. *Exp Physiol* 87, 239-244.
- Lebovits, A. H., Lefkowitz, M., McCarthy, D., Simon, R., Wilpon, H., Jung, R., Fried, E., 1998. The prevalence and management of pain in patients with AIDS: a review of 134 cases. *Clin J Pain* 5, 245-248.
- Lee, J. B., Kuroda, S., Shichinohe, H., Ikeda, J., Seki, T., Hida, K., Tada, M., Sawada, K., Iwasaki, Y., 2003. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology* 23, 169-180.
- Lee, S. E., Shen, H., Taglilatela, G., Chung, J. M., Chung, K., 1998. Expression of nerve growth factor in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *Brain Res* 796, 99-106.
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., Fontecave, M., 1991. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 442-448.
- Levine, J. D., Fields, H. L., Basbaum, A. I., 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13, 2273-2286.
- Levy, D., Zochodne, D. W., 2004. NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract* 4, 11-18.
- Li, C. Y., Song, Y. H., Hilguera, E. S., Luo, Z. D., 2004. Spinal dorsal horn calcium channel α -2-delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 24, 8494-8499.
- Light, A., Perl, E., 1979. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186, 133-150.
- Lin, Q., Zou, X., Ren, Y., Wang, J., Fang, L., Willis, W. D., 2004. Involvement of peripheral neuropeptide Y receptors in sympathetic modulation of acute cutaneous flare induced by intradermal capsaicin. *Neuroscience* 123, 337-347.
- Lipford, G. B., Bauer, M., Blank, R., Reiter, R., Wagner, H., Heeg, K., 1997. CpG-containing

- oligodeoxynucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: A new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 27, 2340-2344.
- Liu, H. X., Hökfelt, T., 2002. The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends Pharmacol Sci* 23, 468-474.
- Liu, X. H., Brumovsky, P. R., Schmidt, R., Brown, W., Payza, K., Hodzic, L., Pou, C., Godbout, C., Hökfelt, T., 2001. Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: selective actions via GalR1 and GalR2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9960-9964.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, D., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Mahmood, A., Chopp, M., 2001a. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18, 813-819.
- Lu, D., Mahmood, A., Wang, L., Li, Y., Lu, M., Chopp, M., 2001b. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 12, 559-563.
- Lu, L., Zhao, C., Liu, Y., Sun, X., Duan, C., Ji, M., Zhao, H., Xu, Q., Yang, H., 2005. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain Res Protoc* 15, 46-51.
- Ma, W., Bisby, M. A., 1997. Differential expression of galanin immunoreactivities in the primary sensory neurons following partial and complete sciatic nerve injury. *Neuroscience* 79, 1183-1195.
- Magone, M. T., Chan, C. C., Beck, L., Whitcup, S. M., Raz, E., 2000. Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis. *Eur J Immunol* 30, 1841-1850.
- Mahmood, A., Lu, D., Chopp, M., 2004. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21, 33-39.
- Mahoney, S. A., Hosking, R., Farrant, S., Holmes, F. E., Jacoby, A. S., Shine, J., Iismaa, T. P., Scott, M. K., Schmidt, R., Wynick, D., 2003. The second galanin receptor GalR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons. *J Neurosci* 23, 416-421.
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P., Gerson, S. L., 2000. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 9, 841-848.

- Mantyh, P. W., Allen, C. J., Rogers, S., DeMaster, E., Ghilardi, J. R., Mosconi, T., Kruger, L., Mannon, P. J., Taylor, I. L., Vigna, S. R., 1994. Some sensory neurons express neuropeptide Y receptors: potential paracrine inhibition of primary afferent nociceptors following peripheral nerve injury. *J Neurosci* 14, 3958-3968.
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., Barbacid, M., 1989. Molecular and biochemical characterization of the human trk protooncogene. *Mol Cell Biol* 9, 24-33.
- Martin, W., Villan, G. M., Jothianandan, D., Furchgott, R. F., 1985. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 232, 708-716.
- Matthews, E. A., Dickenson, A. H., 2001. Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain* 92, 235-246.
- McCleane, G., 2000. Topical application of doxepin hydrochloride, capsaicin and a combination of both produces analgesia in chronic human neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Clin Pharmacol* 49, 574-579.
- McIntyre, K. W., Lombard-Gillooly, K., Perez, J. R., Kunsch, C., Sarmiento, U. M., Larigan, J. D., Landreth, K. T., Narayanan, R., 1993. A sense phosphorothioate oligonucleotide directed to the initiation codon of transcription factor NF-kappa B p65 causes sequence-specific immune stimulation. *Antisense Res Dev* 3, 309-322.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.
- McMahon, S. B., Priestley, J. V., 1995. Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives. *Curr Opin Neurobiol* 5, 616-624.
- McWilliams, L. A., Cox, B. J., Enns, M. W., 2003. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain* 106, 127-133.
- Meller, S. T., Gebhart, G. F., 1993. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52, 127-136.
- Meller, S. T., Lewis, S. J., Bates, J. N., Brody, M. J., Gebhart, G. F., 1990. Is there a role for an endothelium-derived relaxing factor in nociception? *Brain Res* 531, 342-345.
- Meller, S. T., Pechman, P. S., Gebhart, G. F., Maves, T. J., 1992. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 50, 7-10.
- Mense, S., 1986. Slowly conducting afferent fibers from deep tissues: neurobiological properties and central nervous actions. *Prog Sensory Physiol* 6, 139-220.
- Mercadante, S., Arcuri, E., Tirelli, W., Casuccio, A., 2000. Analgesic effect of intravenous

- ketamine in cancer patients on morphine therapy: a randomized, controlled, double-blind, crossover, double-dose study. *J Pain Symptom Manage* 20, 246-252.
- Merskey, H., 1994. Logic, truth and language in concepts of pain. *Qual Life Res* 3, 69-76.
- Merskey, H., Boduk, N., 1994. Classification of chronic pain. IASP Press, Seattle, USA.
- Meyer-Rosenberg, K., Kvarnstrom, A., Kinnman, E., Gorth, T., Nordfors, L., Kristofferson, A., 2001. Peripheral neuropathic pain: a multidimensional burden for patients. *Eur J Pain* 5, 379-389.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., McKercher, S. R., 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.
- Millan, M. J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57, 1-164.
- Millan, M. J., 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66, 355-474.
- Mimeault, M., Batra, S. K., 2006. Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24, 2319-2345.
- Mimura, T., Dezawa, M., Kanno, H., Sawada, H., Yamamoto, Y., 2004. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cells-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg* 101, 806-812.
- Mitchell, S. W., 1867. On the diseases of nerves, resulting from injuries. Contributions relating to the causation and prevention of disease, and to camp diseases. US Sanitary Commissionirs.
- Miyakawa, A., Furue, H., Katafuchi, T., Jiang, N., Yasaka, T., Kato, G., Yoshimura, M., 2005. Action of neuropeptide Y on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 134, 595-604.
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol* 38, 1709-1715.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A., 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
- Moran, T. D., Colmers, W. F., Smith, P. A., 2004. Opioid-like actions of neuropeptide Y in rat substantia gelatinosa: Y1 suppression of inhibition and Y2 suppression of excitation. *J Neurophysiol* 92, 3266-3275.
- Moriguchi, M., Manning, L. R., Manning, J. M., 1992. Nitric oxide can modify aminoacid residues in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 598-604.
- Moriya, K., Matsukura, M., Kurokawa, K., Koike, K., 1996. In vivo inhibition of hepatitis B virus gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochem Biophys Res*

- Commun 218, 217-223.
- Morris, R., Southam, E., Braid, D. J., Garthwaite, J., 1992. Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosci Lett* 137, 29-32.
- Mosconi, T., Kruger, L., 1996. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy; ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64, 37-57.
- Moyle, G. J., Gazzard, B. G., 1999. A risk-benefit assessment of HIV protease inhibitors. *Drug Saf* 20, 299-321.
- Musolino, P. L., Coronel, M. F., Hökfelt, T., Villar, M. J., 2007. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett* 418, 97-101.
- Nahin, R. L., Ren, K., De León, M., Ruda, M., 1994. Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 58, 95-108.
- Naik, A. K., Tandan, S. K., Kumar, D., Dudhgaonkar, S. P., 2006. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 530, 59-69.
- Nalamachu, S., Crockett, R. S., Mathur, D., 2006. Lidocaine patch 5% for carpal tunnel syndrome: how it compares with injections: a pilot study. *J Fam Pract* 55, 209-214.
- Nathan, C. F., Hibbs, J. B., 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3, 65-70.
- Naveilhan, P., Hassani, H., Lucas, G., Blakeman, K. H., Hao, J. X., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Thoren, P., Ernfors, P., 2001. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. *Nature* 409, 513-517.
- Ness, T., Gebhart, G. F., 1990. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 41, 167-234.
- Neuhuber, B., Timothy Himes, B., Shumsky, J. S., Gallo, G., Fischer, I., 2005. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res* 1035, 73-85.
- Nichols, N., Oldford, D., Duke, S., 2007. NURSE: Nitroglycerin Use: Revisiting Strategies for Efficacy. *Can J Cardiovasc Nurs* 17, 31-38.
- Nicholson, B., Verma, S., 2004. Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Medicine* 5, S9-S27.
- Nie, M., Selbie, L. A., 1998. Neuropeptide Y Y₁ and Y₂ receptor-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase activity. *Regul Peptides* 75, 207-213.
- Nurmikko, T., 1995. Clinical features and pathophysiologic mechanisms of postherpetic neuralgia. *Neurology* 45, 54-55.

- O'Donnell, D., Ahmad, S., Wahlestedt, C., Walker, P., 1999. Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1. *J Comp Neurol* 409, 469-481.
- Obata, K., Tsujino, H., Yamanaka, H., Yi, D., Fukuoka, T., Hashimoto, N., Yonenobu, K., Yoshikawa, H., Noguchi, K., 2002. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. *Pain* 99, 121-132.
- Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., Mizuta, E., Kuno, S., Ide, C., 2004. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 187, 266-278.
- Orza, F., Boswell, M., Rosenberg, S., 2000. Neuropathic pain: review of mechanisms and pharmacologic management *Neurorehabilitation* 14, 15-23.
- Ossipov, M. H., Zhang, E. T., Carvajal, C., Gardell, L., Quirion, R., Dumont, Y., Lai, J., Porreca, F., 2002. Selective mediation of nerve injury-induced tactile hypersensitivity by neuropeptide Y. *J Neurosci* 22, 9858-9867.
- Owen, M., Friedenstein, A. J., 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium* 136, 42-60.
- Owens, M. W., Grisham, M. B., 1993. Nitric oxide synthesis by rat pleural mesothelial cells: induction by cytokines and lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 265, 110-116.
- Paoletti, C., 1988. Anti-sense oligonucleotides as potential antitumour agents: prospective views and preliminary results. *Anticancer Drug Dev* 2, 325-331.
- Parker, E. M., Izzarelli, D. G., Nowak, H. P., Mahle, C. D., Iben, L. G., Wang, J., Goldstein, M. E., 1995. Cloning and characterization of the rat GALR1 galanin receptor from Rin14B insulinoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 34, 179-189.
- Phillips, H. J., 1973. Dye exclusion tests for cell viability. *Tissue Culture: Methods and Applications Chapter 3*, 406-408, Academic Press, New York, USA.
- Pickel, V. M., Beck-Sickinger, A. G., Chan, J., Wieland, A., 1988. Y1 receptors in the nucleus accumbens: ultrastructural localization and association with neuropeptide Y. *J Neurosci Res* 52, 54-68.
- Pluchino, S., Martino, G., 2005. The therapeutic use of stem cells for myelin repair in autoimmune demyelinating disorders. *J Neurol Sci* 233, 117-119.
- Polomano, R. C., Mannes, A. J., Clark, U. S., Bennett, G. J., 2001. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 94, 293-304.
- Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J. X., Xu,

- X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Bartfai, T., Langel, U., 1998. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Natl Biotechnol* 16, 857-861.
- Post, C., Alari, L., Hökfelt, T., 1988. Intrathecal galanin increases the latency in the tail-flick and hot-plate test in mouse. *Acta Physiol Scand* 132, 583-584.
- Prockop, D. J., 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Prockop, D. J., Azizi, S. A., Phinney, D. G., G.C., K., Schwarz, E. J., 2000. Potential use of marrow stromal cells as therapeutic vectors for diseases of the central nervous system. *Prog Brain Res* 128, 293-297.
- Przewlocki, R., Przewlocka, B., 2005. Opioids in neuropathic pain. *Curr Pharm Des* 11, 3013-3025.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., Moncada, S., 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5193-5197.
- Raja, S. N., Haythornthwaite, J. A., Pappagallo, M., Clark, M. R., Travison, T. G., Sabeen, S., Royall, R. M., Max, M. B., 2002. Opioids versus antidepressants in postherpetic neuralgia: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology* 59, 1015-1021.
- Ralston, H., Ralston, D., 1982. The distribution of dorsal root axons to laminae IV, V and VI of the spinal cord: a quantitative electron microscopy study. *J Comp Neurol* 212, 435-448.
- Rankin, R., Pontarollo, R., Ioannou, X., Krieg, A. M., Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., 2001. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11, 333-340.
- Reeve, A., Walker, K., Urban, L., Fox, A., 2000. Excitatory effects of galanin in the spinal cord of intact, anaesthetized rats. *Neurosci Lett* 295, 25-28.
- Rexed, B., 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 96, 415-466.
- Ribera, M. V., 2003. Síndrome de dolor regional complejo tipo I y II. *Dolor* 18, 83-84.
- Rodríguez, J. M., Elías, F., Fló, J., López, R. A., Zorzopulos, J., Montaner, A., 2006. Immunostimulatory PyNTTTTGT oligodeoxynucleotides: structural properties and refinement of the active motif. *Oligonucleotides* 16, 275-285.
- Rodriguez Parkitna, J., Korostynski, M., Kaminska-Chowaniec, D., Obara, I., Mika, J., Przewlocka, B., Przewlocki, R., 2006. Comparison of gene expression profiles in neuropathic and inflammatory pain. *J Physiol Pharmacol* 57, 401-414.

- Rokaeus, A., Melander, T., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V., 1984. A galanin-like peptide in the central nervous system and intestine of the rat. *Neurosci Lett* 47, 161-166.
- Rowan, S., Todd, A. J., Spike, R. C., 1993. Evidence that neuropeptide Y is present in GABAergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 53, 537-545.
- Rowbotham, M. C., 2005. Mechanisms of neuropathic pain and their implications for the design of clinical trials. *Neurology* 65, 66-73.
- Saarto, T., Wiffen, P. J., 2006. Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 20, CD005454.
- Salter, M., Duffy, C., Garthwaite, J., Strijbos, P. J., 1996. Ex vivo measurements of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *J Neurochem* 66, 1683-1690.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., Sanberg, P. R., 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164, 247-256.
- Sato, J., Perl, E. R., 1991. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science* 251, 1608-1610.
- Savitz, S. I., Dinsmore, J. H., Wechsler, L. R., Rosenbaum, D. M., Caplan, L. R., 2004. Cell therapy for stroke. *NeuroRx* 1, 406-414.
- Scadding, J. W., 1999. Peripheral neuropathies. In: *Textbook of pain*. P. Wall, R. Melzak (Eds.), Churchill Livingstone, London, United Kingdom.
- Schafers, M., Lee, D. H., Brors, D., Yaksh, T. L., Sorkin, L. S., 2003a. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 23, 3028-3038.
- Schafers, M., Sorkin, L. S., Geis, C., Shubayev, V. I., 2003b. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett* 347, 179-182.
- Schmader, K., 2007. Herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *Clin Geriatr Med* 23, 615-632.
- Schwartz, H., 1951. War injuries of the spinal cord and peripheral nerves. *Mo Med* 48, 692-695.
- Segieth, J., Getting, S. J., Biggs, C. S., Whitton, P. S., 1995. Nitric oxide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats. *Neurosci Lett* 200, 101-104.
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205-218.

- Shehab, S. A., Atkinson, M. E., 1986. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons. *Brain Res* 372, 37-44.
- Shen, H., Chung, J. M., Chung, K., 1999. Expression of neurotrophin mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve injury. *Mol Brain Res* 64, 186-192.
- Shi, T. J., Cui, J. G., Meyerson, B. A., Linderoth, B., Hökfelt, T., 1999. Regulation of galanin and neuropeptide Y in dorsal root ganglia and dorsal horn in rat mononeuropathic models: possible relation to tactile hypersensitivity. *Neuroscience* 93, 741-757.
- Shi, T. J., Holmberg, K., Xu, Z. Q., Steinbusch, H., de Vente, J., Hökfelt, T., 1998a. Effect of peripheral nerve injury on cGMP and nitric oxide synthase levels in rat dorsal root ganglia: time course and coexistence. *Pain* 78, 171-180.
- Shi, T. J., Hua, X. Y., Lu, X., Malkmus, S., Kinney, J., Holmberg, K., Wirz, S., Ceccatelli, S., Yaksh, T., Bartfai, T., Hökfelt, T., 2006a. Sensory neuronal phenotype in galanin receptor 2 knockout mice: focus on dorsal root ganglion neurone development and pain behavior. *Eur J Neurosci* 23, 627-236.
- Shi, T. J., Li, J., Dahlstrom, A., Theodorsson, E., Ceccatelli, S., Decosterd, I., Pedrazzini, T., Hökfelt, T., 2006b. Deletion of the neuropeptide Y Y1 receptor affects pain sensitivity, neuropeptide transport and expression, and dorsal root ganglion neuron numbers. *Neuroscience* 140, 293-304.
- Shi, T. J., Zhang, X., Berge, O. G., Erickson, J. C., Palmiter, R. D., Hökfelt, T., 1998b. Effect of peripheral axotomy on dorsal root ganglion neuron phenotype and autonomy behaviour in neuropeptide Y-deficient mice. *Regul Pept* 75, 161-173.
- Shi, T. J. S., Zhang, X., Holmberg, K., Xu, Z. Q., Hökfelt, T., 1997. Expression and regulation of galanin-R2 receptors in rat primary sensory neurons: effect of axotomy and inflammation. *Neurosci Lett* 237, 57-60.
- Shim, W. S., Jiang, S., Wong, P., Tan, J., Chua, Y. L., Tan, Y. S., Sin, Y. K., Lim, C. H., Chua, T., Teh, M., Liu, T. C., Sim, E., 2004. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 481-488.
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., Simmons, P. J., 2003. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 34, 565-571.
- Shu, S. N., Wei, L., Wang, J. H., Zhan, Y. T., Chen, H. S., Wang, Y., 2004. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 10, 2818-2822.
- Silva, A. P., Cavadas, C., Grouzmann, E., 2002. Neuropeptide Y and its receptors as potential

- therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta* 326, 3-25.
- Simmons, D. R., Spike, R. C., Todd, A. J., 1995. Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 187, 119-122.
- Sindrup, S. H., Jensen, T. H., 1999. Effects of pharmacological treatment of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83, 389-400.
- Sindrup, S. H., Otto, M., Finnerup, N. B., Jensen, T. S., 2005. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96, 399-409.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D. M., 1985. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6, 509-546.
- Smith, K. E., Walker, M. W., Artymyshyn, R., Bard, J., Borowsky, B., Tamm, J. A., Yao, W. J., Vaysee, P. J., Branchek, T. A., Gerald, C., Jones, K. A., 1998. Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 273, 23321-23326.
- Smith, P. A., Moran, T. D., Abdulla, F., Tumber, K. K., Taylor, B. K., 2007. Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides* (in press).
- Smith, W. C., Bourne, D., Squair, J., Phillips, D. O., Chambers, W. A., 1999. A retrospective cohort study of post mastectomy pain syndrome. *Pain* 83, 91-95.
- Soares, S., Traka, M., von Boxberg, Y., Bouquet, C., Karagogeos, D., Nothias, F., 2005. Neuronal and glial expression of the adhesion molecule TAG-1 is regulated after peripheral nerve lesion or central neurodegeneration of adult nervous system. *Eur J Neurosci* 21, 1169-1180.
- Son, S. J., Lee, K. M., Jeon, S. M., Park, E. S., Park, K. M., Cho, H. J., 2007. Activation of transcription factor c-jun in dorsal root ganglia induces VIP and NPY upregulation and contributes to the pathogenesis of neuropathic pain. *Exp Neurol* 204, 467-472.
- St-Pierre, J. A., Nouel, D., Dumont, Y., Beaudet, A., Quirion, R., 2000. Association of neuropeptide Y Y1 receptors with glutamate-positive and NPY-positive neurons in the rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 12, 1319-1330.
- Stanton-Hicks, M., Janig, W., Hassenbusch, S., Haddock, J. D., Boas, R., Wilson, P., 1995. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain* 63, 127-133.
- Stein, C. A., Cohen, J. S., 1988. Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer Res* 48, 2659-2668.
- Strott, C. A., Ray, P., 1977. Studies of a colchicine-binding protein (tubulin) in the adrenal cortex and brain. *Biochem Biophys Acta* 495, 119-128.
- Sun, Q. Q., Huganard, J. R., Prince, D. A., 2001. Neuropeptide Y receptors differentially modulate

- G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat thalamic neurons. *J Physiol* 531, 67-79.
- Sunderland, S., 1993. Nerves and nerve injuries. London: Churchill Livingstone.
- Suzuki, H., Taguchi, T., Tanaka, H., Kataoka, H., Li, Z., Muramatsu, K., Gondo, T., Kawai, S., 2004. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 918-922.
- Taiwo, O. B., Taylor, B. K., 2002. Antihyperalgesic effects of neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain* 96, 353-363.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V., 1982. Neuropeptide Y, a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659-660.
- Tatemoto, K., Rokaeus, A., Jornvall, H., McDonald, T. J., Mutt, V., 1983. Galanin-a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164, 124-128.
- Taylor, C. W., 2002. Controlling calcium entry. *Cell* 111, 767-769.
- Tepperman, B. L., Brown, J. F., Whittle, B. J., 1993. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* 265, 214-218.
- Tesfaye, S., Stevens, L., Stephenson, J., Fuller, J. H., Plater, H., Ionescu-Tirgoviste, C., Nuber, A., Pozza, G., Ward, J. D., 1996. The prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: The EURODIAB IDDM complications study. *Diabetologia* 39, 1377-1384.
- Thippeswamy, T., Jain, R. K., Numtaz, M., Morris, R., 2001a. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase results in neurodegenerative changes in axotomised dorsal root ganglion neurons: evidence for a neuroprotective role of nitric oxide in vivo. *Neurosci Res* 44, 37-44.
- Thippeswamy, T., McKay, J. S., Morris, R., 2001b. Bax and caspases are inhibited by endogenous nitric oxide in dorsal root ganglion neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 14, 1229-1236.
- Thippeswamy, T., McKay, J. S., Morris, R., Quinn, J., Wong, L. F., Murphy, D., 2005. Glial-mediated neuroprotection: evidence for the protective role of the NO-cGMP pathway via neuron-glia communication in the peripheral nervous system. *Glia* 49, 197-210.
- Thippeswamy, T., Morris, R., 1997a. Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 774, 116-122.
- Thippeswamy, T., Morris, R., 1997b. Nerve growth factor inhibits the expression of nitric oxide synthase in neurons in dissociated cultures of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 230, 9-12.

- Tominaga, M., Caterina, M. J., 2004. Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61, 3-12.
- Topp, K. S., Tanner, K. D., Levine, J. D., 2000. Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol* 424, 563-576.
- Tracey, D. J., Romm, M. A., Yao, N. N. L., 1995. Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: exacerbation by neuropeptide Y. *Brain Res* 669, 245-254.
- Treede, R. D., Meyer, R. A., Campbell, J. N., 1990. Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-fiber nociceptors in monkey. *J Neurophysiol* 64, 1502-1513.
- Treede, R. D., Meyer, R. A., Raja, S. N., Campbell, J. N., 1992. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38, 397-421.
- Truini, A., Cruccu, G., 2006. Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain. *Neurol Sci* 27, 179-182.
- Tuchscherer, M. M., Seybold, V. S., 1989. A quantitative study of the coexistence of peptide in varicosities within the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 9, 195-205.
- Ulrich-Lai, Y. M., 2001. Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from rat trigeminal ganglion: evidence for intraganglionic neurotransmission. *Pain* 91, 219-226.
- Urban, L., Thompson, S. W., Dray, A., 1994. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci* 17, 432-438.
- Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Rustioni, A., 1992a. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 321, 209-222.
- Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Rustioni, A., Schmidt, H. H., 1992b. Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* 148, 6-10.
- Van Wangenen, S., Rehder, V., 2001. Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide depends on soluble guanylyl cyclase. *J Neurobiol* 46, 206-219.
- Verge, V. M., Richardson, P. M., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., 1995. Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 15, 2081-2096.
- Verge, V. M., Xu, Z., Xu, X. J., Wiesenfeld Hallin, Z., Hökfelt, T., 1992a. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11617-11621.
- Verge, V. M. K., Merlio, J. P., Grondin, J., Ernfors, P., Persson, H., Riopelle, R. J., Hökfelt, T.,

- Richardson, P. M., 1992b. Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *J Neurosci* 12, 4011-4022.
- Verma, S., Micsa, E., Estanislao, L., Simpson, D., 2004. Neuromuscular complications in HIV. *Curr Neurol Neurosci Rep* 4, 62-67.
- Villar, M., Cortés, R., Theodorsson, E., Wiesenfeld-Hallin, Z., Schalling, M., Fahrenkrug, J., Emson, P., Hökfelt, T., 1989. Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience* 33, 587-604.
- Villar, M. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., Theodorsson, E., Emson, P. C., Hökfelt, T., 1991. Further studies on galanin-, substance P-, and CGRP-like immunoreactivities in primary sensory neurons and spinal cord: effects of dorsal rhizotomies and sciatic nerve lesions. *Exp Neurol* 112, 29-39.
- Wahlestedt, C., Yanaihara, N., Hakanson, R., 1986. Evidence for differential pre- and postjunctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul Pept* 13, 307-318.
- Wakisaka, S., Kajander, K. C., Bennett, G. J., 1991. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neurosci Lett* 124, 200-203.
- Wakisaka, S., Kajander, K. C., Bennett, G. J., 1992. Effects of peripheral nerve injuries and tissue inflammation on the levels of neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat primary afferent neurons. *Brain Res* 598, 349-352.
- Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., Tomkiewicz, M. M., 1979. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7, 103-113.
- Wallace, M. S., Wallace, A. M., Lee, J., Dobke, M. K., 1996. Pain after breast surgery: a survey of 282 women. *Pain* 66, 195-205.
- Wang, H., Sun, H., Della Penna, K., Benz, R. J., Xu, J., Gerhold, G. L., Holder, D. J., Koblan, K. S., 2002a. Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 114, 529-546.
- Wang, H. F., Shortland, P., Park, M. J., Grant, G., 1998a. Retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase-conjugated cholera toxin B subunit, wheatgerm agglutinin and isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in primary afferent neurons innervating the rat urinary bladder. *Neuroscience* 87, 275-288.
- Wang, L., Li, Y., Chen, J., Gautam, S. C., Zhang, Z., Lu, M., Chopp, M., 2002b. Ischemic cerebral

- tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol* 30, 831-836.
- Wang, L., Li, Y., Chen, X., Chen, J., Gautam, S. C., Xu, Y., Chopp, M., 2002c. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 7, 113-117.
- Wang, S., Hashemi, T., Fried, S., Clemmons, A. L., Hawes, B. E., 1998b. Differential intracellular signalling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. *Biochemistry* 37, 6711-6717.
- Wang, S. J., 2005. Activation of neuropeptide Y Y1 receptors inhibits glutamate release through reduction of voltage-dependent Ca²⁺ entry in the rat cerebral cortex nerve terminals: suppression of this inhibitory effect by the protein kinase C-dependent facilitatory pathway. *Neuroscience* 134, 987-1000.
- Waters, S. M., Krause, J. E., 2000. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95, 265-271.
- Weaver, B. A., 2007. The burden of herpes zoster and postherpetic neuralgia in the United States. *J Am Osteopath Assoc* 197, 2-7.
- Weeratna, R., McCluskie, M. J., Yu, X., Davis, H. L., 2000. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 18, 1755-1762.
- Weisenberg, R. C., Borisy, G. G., Taylor, E. W., 1968. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* 7, 4466-4479.
- White, D. M., 1997. Intrathecal neuropeptide Y exacerbates nerve injury-induced mechanical hyperalgesia. *Brain Res* 750, 141-146.
- White, F. A., Sun, J., Waters, S. M., Ma, C., Ren, D., Ripsch, M., Steflik, J., Cortright, D. N., LaMotte, R. H., Miller, R. J., 2005. Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signalling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *PNAS* 102, 14092-14097.
- Wickstrom, E. L., Bacon, T. A., González, A., Freeman, D. L., Lyman, G. H., Wickstrom, E., 1988. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 1028-1032.
- Wiertelak, E., Smith, K., Furness, L., Mooney-Heiberger, K., Maier, S., Watkins, L., 1994. Acute and conditioned hyperalgesic responses to illness. *Pain* 56, 227-234.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M. J., Hökfelt, T., 1988. Intrathecal galanin at low doses increases spinal reflex excitability in rats more to thermal than mechanical stimuli. *Exp Brain Res* 71, 663-666.

- Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M. J., Hökfelt, T., 1989a. The effects of intrathecal galanin and C-fiber stimulation on the flexor reflex in the rat. *Brain Res* 486, 205-213.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, J. X., Villar, M. J., Hökfelt, T., 1989b. The effect of intrathecal galanin on the flexor reflex in rat: increased depression after sciatic nerve section. *Neurosci Lett* 105, 149-154.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., 2001. Neuropeptides in neuropathic and inflammatory pain with special emphasis on cholecystokinin and galanin. *Eur J Pharmacol* 429, 49-59.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., Crawley, N. J., Hökfelt, T., 2005. Galanin and spinal nociceptive mechanisms: recent results from transgenic and knock-out models. *Neuropeptides* 39, 207-210.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., Langel, U., Bedecs, K., Hökfelt, T., Bartfai, T., 1992. Galanin-mediated control of pain: enhanced role after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3334-3337.
- Willis, W. D., 2002. Long-term potentiation in spinothalamic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 40, 202-214.
- Willis, W. D., Coggeshall, R. E., 1991. Dorsal root ganglion cells and their processes. In: *Sensory mechanisms of the spinal cord*. W.D. Willis and R.E. Coggeshall (Eds.), Plenum Press, New York, USA.
- Woodbury, D., Schwartz, E. J., Prockop, D. J., Black, I. B., 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364-370.
- Wooldrige, J. E., Ballas, Z. K., Krieg, A. M., Weiner, G. J., 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 89, 2994-2998.
- Wu, G., Ringkamp, M., Hartke, T. V., Murinson, B. B., Campbell, J. N., Griffin, J. W., Meyer, R. A., 2001. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci* 21, 140-145.
- Wynick, D., Bacon, A., 2002. Targeted disruption of galanin: new insights from knock-out studies. *Neuropeptides* 36, 132-144.
- Wynick, D., Thompson, S. W. N., McMahon, S. B., 2001. The role of galanin as a multifunctional neuropeptide in the nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 1, 73-77.
- Xiao, H. S., Huang, Q. H., Zhang, F. X., Bao, L., Lu, Y. J., Guo, C., Yang, L., Huang, W. J., Fu, G., Hu, S. H., Cheng, X. P., Yan, Q., Zhu, Z. D., Zhang, X., Chen, Z., Han, Z. G., 2002. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8360-8365.

- Xu, I., Hao, J. X., Xu, X. J., Hökfelt, T., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1999. The effect of intrathecal selective agonists of Y1 and Y2 neuropeptide Y receptors on the flexor reflex in normal and axotomized rats. *Brain Res* 833, 251-257.
- Xu, X. J., Hökfelt, T., Bartfai, T., Wiesenfeld-Hallin, Z., 2000. Galanin and spinal nociceptive mechanisms: recent advances and therapeutic implications. *Neuropeptides* 34, 137-147.
- Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M. J., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., 1990. On the role of galanin, substance P and other neuropeptides in primary sensory neurons of the rat: studies on spinal reflex excitability and peripheral axotomy. *Eur J Neurosci* 2, 733-734.
- Xu, Z.-Q., Shi, T.-J., Landry, M., Hökfelt, T., 1996. Evidence for galanin receptors in primary sensory neurons and effect of axotomy and inflammation. *Neuroreport* 8, 237-242.
- Yamada, K., Nabeshima, T., 1997. Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. *J Neurochem* 68, 1234-1243.
- Yanagisawa, M., Yagi, N., Otsuka, M., Yanaihara, C., Yanaihara, N., 1986. Inhibitory effects of galanin on the isolated spinal cord of the newborn rat. *Neurosci Lett* 70, 278-282.
- Yao, G. Q., Grill, S., Egan, W., Cheng, Y. C., 1993. Potent inhibition of Epstein-Barr virus by phosphorothioate oligodeoxynucleotides without sequence specification. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1420-1425.
- Zamboni, L., De Martino, C., 1967. Buffered picric acid formaldehyde. A new rapid fixation for electron microscopy. *J Cell Biol* 35, 148.
- Zhang, P., He, X., Liu, K., Zhao, F., Fu, Z., Zhang, D., Zhang, Q., Jiang, B., 2004. Bone marrow stromal cells differentiated into functional Schwann cells in injured rat sciatic nerve. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 32, 509-518.
- Zhang, X., Bao, L., Xu, Z. Q., Kopp, J., Arvidsson, U., Elde, R., Hökfelt, T., 1994a. Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat nervous system with special reference to somatic receptors on small dorsal root ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11738-11742.
- Zhang, X., Ju, G., Elde, R., Hökfelt, T., 1993a. Effect of peripheral nerve cut on neuropeptides in dorsal root ganglia and the spinal cord of monkey with special reference to galanin. *J Neurocytol* 22, 342-381.
- Zhang, X., Nicholas, A. P., Hökfelt, T., 1995. Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord--II. Coexistence of galanin with other peptides in local neurons. *Neuroscience* 64, 875-891.
- Zhang, X., Shi, T., Holmberg, K., Landry, M., Huang, W., Xiao, H., Ju, G., Hökfelt, T., 1997.

- Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 729-734.
- Zhang, X., Tong, Y. G., Bao, L., Hökfelt, T., 1999. The neuropeptide Y Y1 receptor is a somatic receptor on dorsal root ganglion neurons and a postsynaptic receptor on somatostatin dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* 11, 2211-2225.
- Zhang, X., Verge, V., Wiesenfeld Hallin, Z., Ju, G., Brecht, D., Snyder, S. H., Hökfelt, T., 1993b. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335, 563-575.
- Zhang, X., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., 1994b. Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 6, 43-57.
- Zhang, X., Xiao, H. S., 2005. Gene array analysis to determine the components of neuropathic pain signalling. *Curr Opin Mol Ther* 7, 532-537.
- Zhang, X., Xu, Z. Q., Shi, T. J., Landry, M., Holmberg, K., Ju, G., Tong, Y. G., Bao, L., Cheng, Z., Wiesenfeld-Hallin, Z., Lozano, A., Dostrovsky, J., Hökfelt, T., 1998. Regulation of expression of galanin and galanin receptors in dorsal root ganglia and spinal cord after axotomy and inflammation. *Ann NY Acad Sci* 863, 402-413.
- Zhou, X. F., Debg, Y. S., Chie, E., Xue, Q., Zhong, J. H., McLachlan, E. M., Rush, R. A., Xian, C. J., 1999. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *Eur J Neurosci* 11, 1711-1722.
- Zietlow, R., Lane, E. L., Dunnett, S. B., Rosser, A. E., 2007. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res* (in press).
- Zimmerman, M., 1976. Neurophysiology of nociception. In: *Neurophysiology of nociception*. R. Porter (Ed.), University Park, Baltimore, USA.
- Zimmermann, M., 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429, 23-37.
- Zochodne, D. W., 2000. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl* 9, 33-38.
- Zochodne, D. W., Levy, D., 2005. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol* 5, 255-267.
- Zochodne, D. W., Misra, M., Cheng, C., Sun, H., 1997. Inhibition of nitric oxide synthase enhances peripheral nerve regeneration in mice. *Neurosci Lett* 228, 71-74.
- Zon, G., 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res* 5, 539-549.

Zurita, M., Vaquero, J., 2004. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport* 15, 1105-1108.