



UNIVERSIDAD
AUSTRAL

**CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

DOLOR CRÓNICO Y NEURONAS SENSITIVAS

ANÁLISIS NEUROQUÍMICO, CONDUCTUAL Y TERAPÉUTICO EN ROEDORES

CHRONIC PAIN AND SENSORY NEURONS

NEUROCHEMICAL, BEHAVIORAL AND THERAPEUTIC ANALYSIS IN RODENTS

MÉDICA MARIANA MALET

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Tesis presentada para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral

Director: Dr. Pablo R. Brumovsky

Co-Directora: Dra. Lucía Policastro

**Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional
(IIMT)**

**CONICET – Universidad Austral Pilar, Buenos Aires,
Argentina, 2016**

Resumen

En el presente trabajo de tesis doctoral fueron estudiados los sistemas neuronales involucrados en la transmisión del dolor, enfocándonos en las neuronas aferentes primarias y en la médula espinal, su neuroquímica y cambios frente a diferentes tipos de lesión periférica (incluyendo la de nervios que suplen estructuras viscerales y/o no-viscerales), y la posible asociación existente entre tales cambios y la conducta del dolor de los animales en estudio. Asimismo, se exploró el potencial analgésico de la modulación de un receptor asociado al neuropéptido tirosina, o la utilización de células mononucleares de médula ósea. Finalmente, dimos los primeros pasos para el uso de micropartículas como agentes de administración de drogas analgésicas.

Fueron realizados estudios morfológicos, inmunohistoquímicos y por hibridación *in situ* de diferentes moléculas y marcadores en los ganglios anexos a la raíz dorsal y la médula espinal de roedores. Asimismo, se llevaron a cabo estudios que permitieron el análisis de la conducta del dolor de animales lesionados y tratados con diferentes estrategias terapéuticas experimentales. Finalmente, se condujeron experimentos para la fabricación de micropartículas y su cargado con drogas analgésicas.

Así, estudiamos la expresión de los *transcriptos de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTS) tipos 1-3* en neuronas aferentes primarias y de la médula espinal del ratón y observamos que el VGLUT2 es el transportador más abundantemente expresado, seguido por el VGLUT1 y el VGLUT3. También descubrimos que sólo el VGLUT3 muestra alteración en su expresión ganglionar luego de la axotomía del nervio ciático.

En ratones con *lesión de las ramas tributarias de los nervios pélvico y pudendo*, analizamos la alteración en la expresión de varios marcadores relacionados a la nocicepción, y observamos que los mismos son comparables con aquellos detectados luego de la lesión de un nervio no-visceral. Esto sugiere la posible participación de tales moléculas en los mecanismos del dolor asociado a la lesión de nervios mixtos viscerales y no-viscerales.

El análisis de la aplicación por vía intratecal de un agonista del *receptor tipo 1 del neuropéptido tirosina (Y1R)* luego de una lesión por compresión crónica del nervio ciático en la rata, mostró que la activación espinal del Y1R conlleva a un efecto antialodínico mecánico y térmico dosis-dependiente. Por otro lado, la aplicación sistémica de *células mononucleares de médula ósea* en ratas sometidas a una lesión por compresión transitoria del nervio ciático conllevó a una mejora en la regeneración y recuperación funcional del nervio dañado, así como a la prevención del dolor neuropático normalmente observado luego de tal lesión. En suma, las dos estrategias de tratamiento experimental del dolor neuropático presentadas (farmacológica y celular) sugieren alternativas atractivas para el desarrollo futuro de drogas analgésicas.

Finalmente, pusimos a punto la metodología para la síntesis de LMVs y el encapsulado de morfina. Obtuvimos un encapsulado del 43% de morfina, con un patrón de liberación del 34% de la droga en el transcurso de alrededor de 170 hs. Queda por delante optimizar la producción y cargado de estas microparticulas, incluyendo el uso de más de una droga, así como la realización de ensayos de eficacia en diferentes modelos animales de dolor.

Abstract

In the present thesis work, different neuronal systems involved in pain transmission were studied, with a focus on primary afferent neurons and the spinal cord, their neurochemistry and changes after different types peripheral injuries (including those affecting nerves innervating visceral or non-visceral structures), and the possible association between such changes and pain behavior of the animals studied. Likewise, the analgesic potential of the modulation of a receptor associated with neuropeptide tyrosine, or the use of bone marrow mononuclear cells. Finally, we took the first steps towards using microparticles as administration vehicles of analgesic drugs.

Morphological, immunohistochemical and *in situ* hybridization studies of different molecules and markers were conducted in the dorsal root ganglia and the spinal cord of rodents. Likewise, other studies performed allowed the analysis of pain behavior in injured animals that were treated with different experimental therapeutic approaches. Finally, experiments were conducted in order to produce microparticles and their loading with analgesic drugs.

Thus, we studied the transcript expression of the *vesicular glutamate transporters (VGLUTs) types 1-3* in primary afferent neurons and the spinal cord of mice and observed that VGLUT2 is the most abundantly expressed transporter, followed by VGLUT1 and VGLUT3. Also, we discovered that only VGLUT3 shows alterations in its ganglionar expression after sciatic nerve axotomy.

We analyzed changes in the expression of several markers related to nociception in mice with injury of the *tributary branches of the pelvic and pudendal nerves* and observed that these were comparable with the changes observed after injury of a non-visceral nerve. This suggests the possible participation of these

molecules in pain mechanisms associated to injuries of mixed visceral and non-visceral nerves.

Analysis of the intrathecal administration of an agonist of the *neuropeptide tyrosine type 1 receptor (Y1R)* after chronic constriction of the sciatic nerve showed a dose-dependent mechanical and thermal antiallodynic effect. On the other hand, the systemic administration of bone marrow mononuclear cells in rats with crush injury produces an improvement of the regeneration and functional recovery of the damaged nerve, and also the prevention of neuropathic pain normally observed after this type of injury. Altogether, both experimental treatment strategies against neuropathic pain (pharmacological and cellular) presented in this thesis suggest attractive alternatives for the development of future analgesic drugs.

Finally, we optimized the methodology for the production of multivesicular liposomes and the encapsulation of morphine. We encapsulated 43% of the morphine with a release pattern of 34% of the drug in approximately 170 hours. The production and loading of these microparticles, including the use of more than one drug remains to be optimized, as well as the performance of efficacy assays in different animal models of pain.

La presente tesis se basa en resultados y discusiones presentados en los siguientes manuscritos y estudios publicados:

Transcript expression of vesicular glutamate transporters in lumbar dorsal root ganglia and the spinal cord of mice - effects of peripheral axotomy or hindpaw inflammation. Malet M^{*}, Vieytes CA*, Lundgren KH, Seal RP, Tomasella E, Seroogy KB, Hökfelt T, Gebhart GF, Brumovsky PR. *Neuroscience*, 2013, 248:95-111.

*Ambos autores contribuyeron de igual forma en este trabajo.

VGLUTs and Glutamate Synthesis-Focus on DRG Neurons and Pain. Malet M, Brumovsky PR. *Biomolecules*, 2015, 5(4):3416-37. *Revisión*.

Axotomy of tributaries of the pelvic and pudendal nerves induces changes in the neurochemistry of mouse dorsal root ganglion neurons and the spinal cord. McCarthy CJ, Tomasella E, Malet M, Seroogy KB, Hökfelt T, Villar MJ, Gebhart GF, Brumovsky PR. *Brain Structure and Function*, 2016, 221(4):1985-2004.

La activación del receptor tipo 1 del neuropéptido tirosina reduce la alodinia mecánica y al frío en ratas con compresión crónica del nervio ciático. Malet M, Leiguarda C, Gastón G, Brumovsky PR. *Manuscrito*

Systemic transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes axonal regeneration and analgesia in a model of wallerian degeneration. Usach V, Malet M, López Tech M, Lavallo L, Piñero G, Saccoliti M, Cueto A, Brumovsky PR, Brusco A and Setton-Avruj P. *Transplantation, En prensa*.

Desarrollo de liposomas multivesiculares para la liberación controlada de fármacos para el tratamiento del dolor. Giannoni A, Malet M, Lloyd R, Trigoso-Venaró H, Brumovsky PR, Policastro L. *Manuscrito*

ÍNDICE

ABREVIATURAS EMPLEADAS	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO.....	5
1.1 Neurona.....	5
1.2 Macroscopía del Sistema Nervioso	6
1.3 Neuroglía	7
1.4 Meninges	8
2. SISTEMA NEURONALES SENSITIVOS VISCERALES Y NO-VISCERALES.....	10
2.1 GARDs	10
2.2 Subpoblaciones neuronales en los GARDs.....	14
2.3 Terminales periféricas de las neuronas nociceptivas – Nociceptores	15
2.4 Médula espinal.....	17
3. NEUROTRANSMISORES Y RECEPTORES ASOCIADOS A LA TRANSMISIÓN DEL DOLOR – RESPUESTA FRENTE A LESIONES	24
3.1 Sistema glutamatérgico	24
3.2 Sistema Neuropeptidérgico.....	34
3.3 Otros marcadores asociados a neuronas de los GARDS	38
4. DOLOR.....	40
4.1 Dolor nociceptivo vs. dolor neuropático	40
4.2 Estudio del paciente con dolor neuropático	45
4.3. Estrategias actuales de tratamiento	48
5. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL DOLOR	56
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	59
OBJETIVO GENERAL.....	60
OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS	60
MATERIALES Y MÉTODOS	66
1. CONSIDERACIONES ÉTICAS	67
2. ANIMALES	69
3. MODELOS DE LESIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.....	69
3.1 Lesión mecánica.....	69
3.2 Lesión inflamatoria	71
4. PROCEDIMIENTOS FARMACOLÓGICOS / TERAPIA CELULAR.....	77
4.1 Procedimientos farmacológicos	77
4.2 Aislación, caracterización y uso de las CMMO en terapia celular experimental.....	80
5. ANÁLISIS DE LA CONDUCTA DEL DOLOR	88

5.1 Evaluación de alodinia mecánica	88
5.2. Evaluación de la alodinia térmica.....	90
6. ESTUDIOS ELECTROMIOGRÁFICOS	91
7. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	92
7.1. Preparación de las muestras	92
7.2. Técnicas de inmunohistoquímica	93
8. HIBRIDACIÓN IN SITU	94
9. MICROSCOPIA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	96
10. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	97
10.1. Ganglios anexos a la raíz dorsal	97
10.2. Médula espinal	98
10.3. Nervio ciático	98
11. DESARROLLO DE LIPOSOMAS MULTIVESICULARES	99
11.1. Reactivos	99
11.2. Preparación de los LMVs.....	99
11.3. Encapsulado de drogas patrones en los LMVs	100
11.4. Ensayo de estabilidad y liberación	101
11.5. Encapsulación de morfina y ensayos de liberación	102
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
RESULTADOS	108
PROYECTO I.	109
PROYECTO II.	129
PROYECTO III.	155
PROYECTO IV..	167
PROYECTO V.....	187
DISCUSIÓN	208
CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	210
VGLUTs, NEURONAS AFERENTES PRIMARIAS Y ESPINALES, Y DOLOR	214
LESIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS MIXTOS, VISCERALES Y NO-VISCERALES, Y CORRELACIÓN CON DOLOR	240
ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS FARMACOLÓGICAS, CELULARES Y NANOTECNOLÓGICAS CONTRA EL DOLOR CRÓNICO	253
CONCLUSIONES	272
BIBLIOGRAFÍA	284

Abreviaturas empleadas

ABC:	Complejo avidina-biotina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPA:	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANOVA:	Análisis de la varianza
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATF3:	Factor de transcripción dependiente del adenosín monofosfato cíclico 3
BNPI:	Cotransportador de fosfato inorgánico dependiente de sodio
C:	Cervical
Ca⁺⁺:	Calcio
CEMO:	Células estromales de médula ósea
CFA:	Adyuvante completo de Freund
CGRP:	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
Cl⁻:	Cloro
CMAP:	Potencial de acción muscular compuesto
CMH:	Células madre hematopoyéticas
CMM:	Células madre mesenquimales
CMMO:	Células mononucleares de médula ósea
CMN:	Células madre neurales
CS:	Célula de Schwann
CSL:	Cadena simpática lumbar
CSS:	Citrato de sodio salino
DAPI:	(4',6-diamino-2-fenilindol)
DAB:	Diaminobencidina
dH₂O:	Agua destilada
DNPI:	Cotransportador de fosfato inorgánico dependiente de sodio asociado a diferenciación
DOPC:	Dioleoil-fosfatidilcolina
DPL:	Día post lesión
DPPG:	Dipalmitoil-fosfatidilglicerol
DW:	Degeneración walleriana
EAAT:	Transportador de aminoácidos excitatorios
EGFP:	Proteína verde fluorescente amplificada
FCS:	Suero de ternero fetal
FDA:	Administración de drogas y alimentos
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
Gal:	Galanina
GARD:	Ganglio anexo a la raíz dorsal
GLS:	Glutaminasa
GPM:	Ganglio pélvico mayor
HIV:	Virus de la inmunodeficiencia humana
IB4:	Isolectina B4
LCC:	Lesión por compresión crónica

IR:	Inmunorreactividad
K⁺:	Potasio
KO:	Knockout
L:	Lumbar
LCC:	Lesión por compresión crónica
LI:	Lámina I
LII:	Lámina II
LIIe:	Lámina II externa
LIII:	Lámina II interna
LIII:	Lámina III
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LMV:	Liposoma multivesicular
MAPK:	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MBP:	Proteína mielínica básica
mGluR:	Receptor glutamatérgico metabotrópico
MOR:	Receptor opioide mu
Na⁺:	Sodio
NAALADasa:	Enzima dipeptidasa acídica acoplada a la α-N-acetilada
NAAG:	N-acetil-aspartilglutamato
NK1:	Neuroquinina 1
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NP:	Núcleo parabraquial
NPY:	Neuropéptido tirosina
ONSn:	Óxido nítrico sintetasa neural
PBS:	Buffer fosfato salino
PKCγ:	Proteína quinasa C gamma
PN:	Perfil neuronal
PV:	Parvalbúmina
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S:	Sacro
SNA:	Sistema nervioso autónomo
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Sistema nervioso periférico
SP:	Sustancia P
T:	Torácico
TA:	Temperatura ambiente
TH:	Tirosina hidroxilasa
TRPV1:	Receptor de potencial transitorio V1
VGLUT:	Transportador vesicular de glutamato
WDR:	Rango dinámico amplio
Y1R:	Receptor tipo 1 del neuropéptido tirosina
Y2R:	Receptor tipo 2 del neuropéptido tirosina

INTRODUCCIÓN

“La presente tesis se centra en el estudio del dolor crónico, desde las perspectivas morfológica, farmacológica, conductual y terapéutica, y se basa en resultados obtenidos mediante experimentación realizada en roedores (rata y ratón).

Para establecer el marco de referencia en el cual se discutirán todas las consideraciones mencionadas, la presente Introducción se halla organizada en el siguiente orden: **1)** generalidades del sistema nervioso; **2)** presentación de los sistemas neuronales periféricos y centrales (excluyéndose el cerebro y el tronco del encéfalo) involucrados en la transmisión del dolor, **3)** descripción de la neuroquímica de neuronas nociceptivas periféricas y centrales y los cambios inducidos por lesiones de nervios periféricos o la inflamación tisular, **4)** detalle de las diferencias existentes entre dolor agudo y crónico, y descripción de la sintomatología y signos observados en el paciente y las estrategias terapéuticas actuales para su tratamiento, y **5)** una breve reseña de los diferentes modelos animales para el estudio del dolor”.

1. Generalidades del sistema nervioso

1.1 Neurona

La **neurona** es la unidad básica funcional y estructural del sistema nervioso. Funcionalmente, codifica la información y la transmite a otras neuronas o inclusive diversas células no nerviosas. Estructuralmente está formada por un cuerpo celular (pericarion o soma) del cual se originan prolongaciones ramificadas cortas denominadas dendritas (a través de las cuales se establecen la mayoría de los contactos intercelulares) y una prolongación única de variable longitud denominada *axón* que conduce la información del soma hacia otra neurona u órgano blanco.

Las neuronas son clasificadas según la **cantidad de prolongaciones** en:

Unipolares: sólo poseen una prolongación.

Bipolares: emiten una prolongación desde cada extremo del soma neuronal.

Pseudounipolares: la neurona emite una única prolongación que después se separa en forma de "T", dando origen a una rama que se dirige hacia una estructura periférica y otra hacia el asta dorsal de la médula espinal o tronco del encéfalo.

Multipolares: Son neuronas que además del axón poseen gran cantidad de dendritas.

Asimismo, la **longitud del axón** define la existencia de:

Neuronas de proyección (Golgi tipo I): Poseen una gran cantidad de dendritas y un axón muy prolongado que se proyecta a otras áreas del SNC con la sustancia blanca o abandona el SNC como fibra nerviosa periférica.

Interneuronas (Golgi tipo II): Poseen una gran cantidad de dendritas pero su axón es más corto. Son neuronas que se ubican entre otras células del sistema nervioso y median las señales entre muchas de estas neuronas.

1.2 Macroscopía del Sistema Nervioso

Desde el punto de vista macroscópico, el sistema nervioso es dividido en *sistema nervioso central (SNC)* y *periférico (SNP)*. El SNC está conformado por el encéfalo y la médula espinal. Desde el mismo, se desprenden 12 pares craneales y 31 pares de nervios raquídeos compuestos de fibras nerviosas aferentes nacidas en acúmulos neuronales llamados ganglios craneales o *ganglios anexos a la raíz dorsal (GARDs)*, respectivamente. Tanto los pares craneales como los nervios raquídeos contienen fibras nerviosas sensitivas (aferentes) producidas por neuronas aferentes primarias que conectan con receptores localizados en tejidos y órganos, así como fibras nerviosas motoras (eferentes) producidas por motoneuronas espinales que conectan con el órgano efector. Las neuronas aferentes primarias que inervan tejidos como la piel, los músculos o las articulaciones se denominan somáticas o no-viscerales, mientras que aquellas que inervan órganos presentes en cavidades del cuerpo son denominadas espláncnicas o viscerales. Finalmente, existe un sistema compuesto por neuronas denominadas autonómicas, las cuales son agrupadas en lo que da en llamarse *sistema nervioso autónomo (SNA)*. En conjunto, los axones periféricos producidos por neuronas aferentes primarias, motoneuronas y el SNA, conforman el SNP.

1.3 Neuroglía

La neuroglia o células de la glía, es una matriz interneural formada por células estrelladas y fusiformes que presentan propiedades biológicas que influyen en la conectividad neuronal de manera estructural y funcional. La neuroglia proporciona a las neuronas soporte metabólico [1, 2], regula la concentración iónica del espacio extracelular necesaria para la excitabilidad neuronal [3], el flujo sanguíneo local de pequeñas poblaciones neuronales [4], y además libera factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas neuromoduladoras que regulan la estructura, función y conectividad neuronal [5-7]. Las células de la glia se encuentran en una proporción de 10 a 50 veces más que las neuronas y se clasifican en: **astrocitos, oligodendrocitos y microglía en el SNC, y células de Schwann (CS) o células satélite de neuronas ganglionares** en el **SNP** [8].

Los **astrocitos** son las células más abundantes dentro del SNC. Se estima que un solo astrocito puede envolver alrededor de 140.000 sinapsis y unos 4 – 6 somas neuronales, y además puede contactar entre 300 y 600 dendritas neuronales en los roedores [9-11]. Entre sus muchas funciones, los astrocitos tienen un rol directo en la transmisión sináptica, mediante la liberación de moléculas como el glutamato o el *ácido γ -aminobutírico (GABA)* [12-15]. Esto puede alterar la excitabilidad neuronal y por tal motivo ha dado lugar a la hipótesis de "sinapsis tripartita", que postula que los astrocitos interactúan con las neuronas durante las sinapsis, influyendo sobre el procesamiento de la información de los circuitos neuronales [12, 14, 16].

Los **oligodendrocitos** son responsables de la mielinización del SNC. La mielina facilita la propagación del potencial de acción en un fenómeno denominado conducción saltatoria entre los nodos de Ranvier (interrupciones regulares de la

vaina mielínica a lo largo del axón), aumentando la velocidad de conducción. Asimismo, los oligodendrocitos proveen al axón de factores tróficos [1, 17].

Las células de la **microglía** son el único componente celular inmune presente en el SNC, respondiendo a cambios del medioambiente. Bajo condiciones de daño tisular, como infecciones virales o bacterianas del SNC, la microglía tiene un rol fundamental en la restauración de la homeostasis del SNC [18, 19]. La microglía también mantiene la integridad del tejido en condiciones donde no hay inflamación [20-23]. Por último, se ha observado que la microglía ejerce un rol sobre la proliferación y diferenciación de las conexiones sinápticas [24].

Finalmente, la neuroglia del nervio periférico consta de (1) **CS** que sintetizan mielina [25], (2) **CS** que no sintetizan mielina [26] [27], (3) **CS** perisinápticas [25] y (4) **células satélites perineurales** del GARD [28] y de los ganglios autonómicos [29]. La importancia de todas estas células es la inmunomodulación, el mantenimiento de la función normal del sistema nervioso y la respuesta a un daño o enfermedad, incluyendo los mecanismos del dolor y la regeneración [28, 30].

1.4 Meninges

El cerebro y la médula espinal se encuentran envueltos por tres membranas, denominadas meninges. De externo a interno, las mismas son:

Duramadre (paquimeninge)

Es una membrana gruesa, densa e inelástica. En particular a nivel espinal, la duramadre espinal participa de la formación de un espacio comprendido entre la duramadre espinal y el periostio vertebral, denominado **espacio epidural**. Este

espacio es frecuentemente utilizado para la colocación de electrodos para la neuroestimulación eléctrica [31] y la administración de analgésicos y anestésicos que deseen aplicarse de forma local. El área del cuerpo influenciada por la droga de elección depende la localización de la punta de la aguja o catéter en relación a las raíces nerviosas sensitivas y los dermatomas (áreas de piel inervadas por un segmento medular [32]). Es por eso que la analgesia llamada epidural debe ser administrada cerca de las raíces nerviosas que inerven al dermatoma que corresponda al área que requiera analgesia [33]. Por su parte, el **espacio subdural** se encuentra ubicado entre la hoja interna de la duramadre y la aracnoides y es sólo un espacio virtual.

Aracnoides (leptomeninge)

La aracnoides es una fina membrana avascular ubicada entre la hoja interna de la duramadre y la piamadre. No penetra en las cisuras encefálicas y se extiende como epitelio perineural a lo largo de las raíces de los nervios espinales y el nervio óptico. Se encuentra separada de la piamadre por el **espacio subaracnoideo o intratecal**. Dicho espacio, que contiene *líquido cefalorraquídeo (LCR)* y los grandes vasos que irrigan el sistema nervioso, es también utilizado, a nivel espinal, para la administración de drogas analgésicas y anestésicas. De hecho, es el espacio donde se realizan punciones lumbares para administrar anestésicos (anestesia espinal) o analgésicos para el manejo del dolor agudo post-operatorio. En el caso del manejo del dolor crónico, el espacio intratecal es el asiento para la colocación de diversos dispositivos de administración farmacológica tales como los catéteres intratecales asociados a bombas de infusión continua [34-36].

Piamadre

Finalmente, la piamadre es una fina membrana que recubre la superficie del encéfalo y la médula espinal y sigue los contornos de las cisuras del cerebro y el surco anterior de la médula. La piamadre se encuentra separada de la superficie encefálica por el **espacio subpial**.

2. Sistema neuronales sensitivos viscerales y no-viscerales

La percepción de información dolorosa involucra un complejo sistema de estructuras y mecanismos que en última instancia permiten su codificación, transmisión y análisis en los centros neuronales más especializados del SNC. A continuación, se detallan las estructuras comprendidas en dicho sistema y que son estudiadas en la presente tesis.

2.1 GARDs

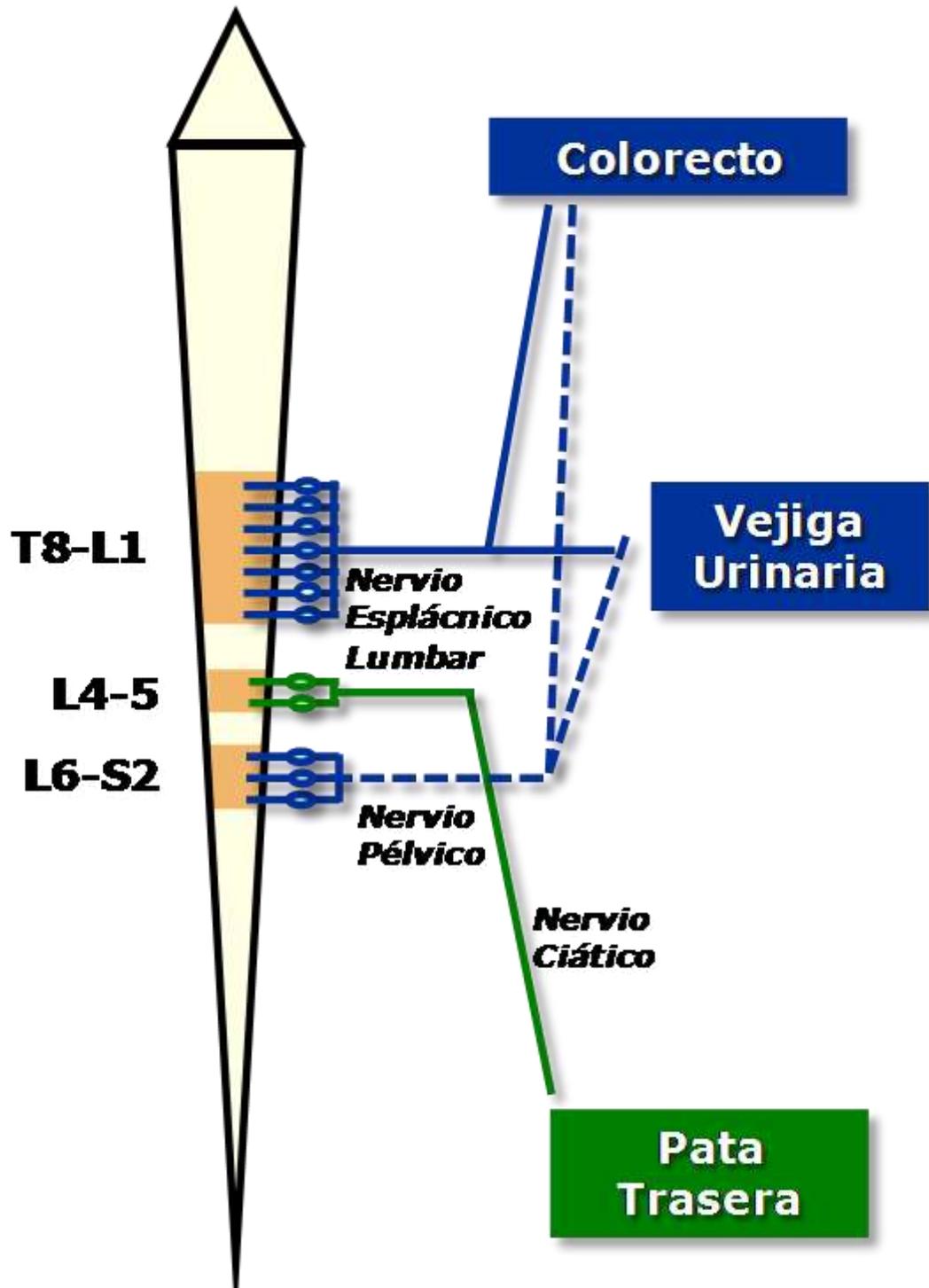
Los somas de las neuronas aferentes primarias involucradas en la transmisión de información dolorosa se encuentran, como se indicó más arriba, en los GARDs. También son halladas en varios de los ganglios asociados a los pares craneales, incluyéndose el ganglio de Gasser del nervio trigémino, o el ganglio inferior del nervio vago, entre otros. Los GARDs se localizan en el foramen de conjunción de las vértebras, cercano al SNC. Los GARDs se designan según el segmento vertebral en el que se encuentren; *cervical (C)*, *torácico (T)*, *lumbar (L)* y *sacro (S)* y el número correspondiente de dicha vértebra en un orden rostro-caudal. El **nervio ciático**, que comúnmente es el objeto de estudio en modelos de lesión nerviosa en roedores

[37], tiene sus somas neuronales sensitivos localizados principalmente en los GARDs L3-L5 en el ratón y L4-L6 en la rata [38] (Figura I.1).

Al contrario de la “simple” inervación de tejidos no viscerales, la inervación de las vísceras es especial. De hecho, como se observa en el ratón, los órganos viscerales, sobre todo aquellos localizados en las cavidades abdominopélvicas, se caracterizan por ser inervados por dos corrientes aferentes “extrínsecas” diferentes: 1) la corriente espinal, que incluye a los **nervios pélvico** y **esplácnico lumbar** [39, 40] (Figura I.1) y 2) la corriente craneal, contribuida por el **nervio vago** [41]. Estas dos corrientes, identificadas mediante el trazado retrógrado de las terminales nerviosas periféricas de órganos torácicos, abdominales y pélvicos, se originan en neuronas viscerales localizadas en ganglios espinales y craneales específicos. En particular para los nervios que se dirigen al colorrecto y la vejiga urinaria, los nervios pélvico y esplácnico lumbar se componen según se describen en la rata y el ratón [39, 42, 43] de axones provenientes de neuronas de los GARDs **toracolumbares** (T8 – L1) y **lumbosacros** (L6 – S1) [39, 44]. A esto se suman las proyecciones postganglionares de neuronas simpáticas pertenecientes a la *cadena simpática lumbar (CSL)* y las neuronas simpáticas y parasimpáticas presentes en el *ganglio pélvico mayor (GPM)* [45-47]. Además, y a diferencia de otros tejidos y órganos del cuerpo, el intestino también cuenta con inervación autonómica “intrínseca”. Esto incluye neuronas sensitivas y motoras autonómicas localizadas en los plexos

Figura I.1 Esquema de la médula espinal (estructura en color amarillo) y los GARDs que dan origen a los nervios espláncnicos lumbares, pélvico y ciático en los roedores. El colorrecto y la vejiga urinaria son ejemplos de órganos pélvicos viscerales que reciben doble inervación de los nervios espláncnicos y pélvicos. Nótese que sólo se esquematizan los GARDs L4-5 como los que originan al nervio ciático e inervan tejidos no-viscerales de la pata posterior (aunque es común una pequeña contribución de L6) (Modificado de [48]).

Figure I.1 Schematic diagram of the spinal cord (structure in yellow) and the dorsal root ganglia (DRG) levels involved in the formation of the lumbar splanchnic, pelvic, and sciatic nerves in rodents. Colorectum and urinary bladder are examples of visceral pelvic organs receiving dual innervation by the lumbar splanchnic and pelvic nerves. Note that, for clarity, only L4–5 DRGs are depicted as supplying the sciatic nerve and innervating non-visceral tissues in the hindlimb (even though a small contribution of L6 is also common) (Modified from [48]).



mientéricos y submucosos, los cuales se extienden del esófago al ano. En su conjunto se denominan **neuronas entéricas** y crean una red neuronal intrínseca [47, 49].

2.2 Subpoblaciones neuronales en los GARDs

Las neuronas de los GARDs se agrupan en diferentes subpoblaciones según su morfología, neuroquímica y características fisiológicas [50]. Así, es posible identificar neuronas de tipo A y tipo B.

En primer lugar, se encuentran las neuronas medianas y grandes (neuronas **de tipo A**), de citoplasma claro y granular [51], las cuales son identificadas por su contenido del **neurofilamento fosforilado de cadena pesada** (200 kDa) y que representa aproximadamente un 40% de las neuronas de los GARDs lumbares [51]. Estas neuronas producen fibras mielínicas gruesas, denominadas **fibras A α / β** , que conducen a alta velocidad (30-100 m/s) [52] y se encuentran normalmente asociadas a la transmisión de estímulos de baja intensidad. El segundo subgrupo de las neuronas de los GARDs (alrededor de un 60%) se caracteriza por ser pequeñas y oscuras (**neuronas de tipo B**), con un citoplasma más uniforme y denso [51], y que expresan **neuropéptidos**, en particular el *péptido relacionado al gen de la calcitonina* (*CGRP según sus siglas en inglés*). Estas neuronas dan origen en su mayoría a axones amielínicos (**fibras C**) y presentan una velocidad de conducción más lenta (0,5 – 2 m/s) [52]. Responden a estímulos intensos y potencialmente dañinos. Generalmente son conocidas como **neuronas nociceptivas** [53, 54]. Finalmente, un tercer subgrupo intermedio comprende a neuronas de tamaño mediano que expresan CGRP y producen axones levemente mielinizados (**fibras**

A δ) [50, 55, 56]. Estas fibras presentan una velocidad de conducción de 12 – 30 m/s [52]. También se incluyen en el grupo de neuronas nociceptivas [57, 58].

2.3 Terminales periféricas de las neuronas nociceptivas – Nociceptores

Las prolongaciones periféricas de las neuronas nociceptivas arriban a los tejidos a inervar a modo de terminaciones libres, es decir, sin asociarse a una estructura receptiva especializada, y son conocidas como **nociceptores**. Según la International Association for the Study of Pain (IASP) un **nociceptor** puede ser definido como *"un receptor preferentemente sensible a un estímulo nocivo o a un estímulo que puede convertirse en nocivo si es sostenido en el tiempo"*.

Los nociceptores se dividen en base al estímulo al cual responden en **mecanonociceptores, termonociceptores y nociceptores polimodales**, lo cual a su vez se debe a las características moleculares de cada terminación libre [59]. Como se indicó más arriba, existen dos grupos principales de neuronas nociceptivas: aquellas que producen fibras A δ y aquellas que producen fibras C [58].

Las fibras A δ pierden su mielina y finalizan como terminaciones libres en la epidermis [60]. Los trabajos realizados en el ratón han demostrado que algunos mecanonociceptores A δ son sensibles a la temperatura. Un 12% es sensible al calor (umbral \sim 42°C) y un 50% es sensible al frío (umbral \sim 8°C) [61]. También se ha reportado la activación de todos los mecanonociceptores A δ por temperaturas mayores a los 45°C [62]. Los mecanonociceptores A δ se adaptan lentamente a un

estímulo, que explica que los estímulos nocivos que activan estas fibras resulten en una sensación dolorosa a lo largo de la duración del estímulo [63].

Al igual que los mecanonociceptores A δ , las fibras amielínicas C, finalizan en la piel como terminaciones libres y son más abundantes que las fibras A δ [64]. Existen distintas subpoblaciones de fibras C dependiendo del tipo de estímulo que las activa. Así, algunas se activan exclusivamente por estímulos mecánicos nocivos, otras solo por calor, algunas por estímulos mecánicos y calor, y otras por estímulos mecánico y frío [61, 63-65]. Sin embargo, es también sabido que una proporción considerable de fibras C es polimodal, y responden a estímulos nocivos de todo tipo: mecánicos, térmicos y químicos (por ejemplo, ácido) [66]. Finalmente, se ha propuesto que en los seres humanos al menos un grupo de estas neuronas se activan frente al tacto placentero en vez de la nocicepción [67].

El porcentaje de fibras C que se activan por calor nocivo varía de estudio en estudio, pero en general alrededor de 70% son sensibles al calor con un umbral de $\sim 40^{\circ}\text{C}$ [61, 64]. En cambio, existe mayor discordancia en cuanto al porcentaje de fibras C polimodales que también son sensibles al frío nocivo. Un estudio refiere que la mayoría de las fibras C que son sensibles al calor también son sensibles al frío con un umbral de $\sim 10^{\circ}\text{C}$ [61]. Sin embargo, otros estudios no han encontrado una proporción tan alta de fibras C sensibles al frío nocivo [68, 69]. Pero, a pesar que se ha observado una variabilidad entre estudios en el porcentaje de fibras C termosensibles, la activación de los umbrales para el calor o frío nocivo de $\sim 40^{\circ}\text{C}$ y $\sim 10^{\circ}\text{C}$ se correlacionan bien con las temperaturas que en los humanos causan dolor por calor o frío, respectivamente [70, 71].

Finalmente, existe un último grupo de fibras C identificado tanto en roedores como en humanos, denominados "**durmientes**" o "**silentes**". En condiciones normales, estas fibras no se activan por estímulos mecánicos o térmicos [72-74], mientras que durante condiciones como por ejemplo la inflamación, estas fibras silentes se sensibilizan, volviéndose reactivas a estímulos mecánicos o térmicos. A este proceso, que también es observado para fibras regulares, se lo denomina sensibilización [75, 76].

2.4 Médula espinal

La **médula espinal** es el sitio de convergencia esencial de la información sensitiva proveniente de neuronas aferentes primarias y su contacto con interneuronas, neuronas de proyección, las terminales axonales provenientes del tronco del encéfalo (proyecciones descendentes) y la neuroglía. Así, el asta dorsal de la médula espinal es el sitio donde ocurre la integración de información sensitiva, siendo sometida a una regulación local y supraespinal excitatoria o inhibitoria [77].

En cortes trasversales de la la médula espinal, se observan dos áreas bien definidas: la **sustancia blanca**, de localización periférica, que rodea la **sustancia gris**, de localización central. La sustancia blanca está formada por fibras nerviosas que se encuentran organizadas en tres cordones (posterior, lateral y anterior) que a su vez se encuentran divididos en haces o tractos que comunican los segmentos medulares entre sí y la médula con el encéfalo o estructuras localizadas fuera del SNC. Por su parte, la sustancia gris está formada principalmente por los somas neuronales y la neuroglia, presentando dos astas, una **ventral** y una **dorsal**, conectadas por una comisura gris transversal atravesada en su porción más central

por el conducto del epéndimo. A nivel tóracolumbar se encuentra una tercer asta denominada intermediolateral donde se localizan los somas de las neuronas preganglionares de la división simpática del SNA. Lo mismo ocurre en los niveles sacros 2 - 4, con la diferencia que allí se localizan los somas de las neuronas preganglionares de la división parasimpática del SNA.

La sustancia gris de la médula espinal está categorizada en función de su citoarquitectura en diez láminas diferentes [78]. Así, el asta dorsal se divide en seis láminas paralelas siendo la lámina I la más superficial y la VI la más cercana al conducto del epéndimo. Luego encontramos una zona intermedia donde se localizan las láminas VII y el área X (siendo esta última el área central o paraependimaria). Y por su parte, en el asta ventral se localizan las láminas VIII y IX, extendiéndose desde el área central a la zona más superficial de la médula espinal, respectivamente. En particular en el asta dorsal, se encuentran cuatro estructuras neuronales clave en la transmisión de información dolorosa:

Terminales centrales de las neuronas aferentes primarias

Las prolongaciones centrales de las neuronas aferentes primarias tienen distintos patrones de terminación dentro del asta dorsal de la médula espinal (Figura I.2). La mayor parte de la información que ingresa a la *lámina I (LI)* es transmitida por las fibras cutáneas A δ y C [53, 79-82]. En esta lámina, también se han observado en otras especies aferencias musculares y articulares [83, 84], así como también viscerales [85-88]. La *lámina II (LII)* se subdivide en *externa (LIIe)* e *interna (LIIi)* [89], recibe principalmente aferencias de fibras C amielínicas [53, 82, 90, 91]. Además, las fibras A δ terminan mayoritariamente en la LIIe [92], y

algunas fibras cutáneas mecanorreceptivas A β alcanzan la LIII vía la *lámina III (LIII)* [91, 93-97]. Finalmente, las fibras A α son las principales aferencias de las LIII-VI [53, 83, 94, 96, 97].

Interneuronas

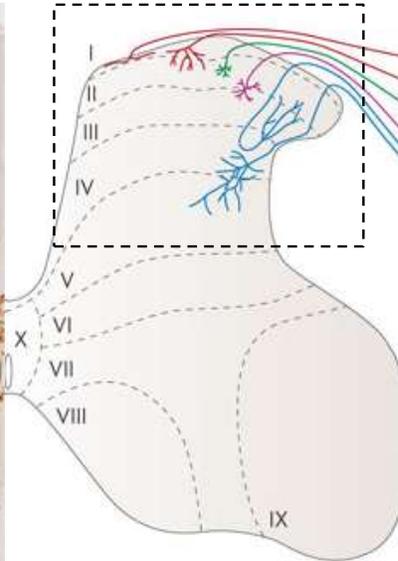
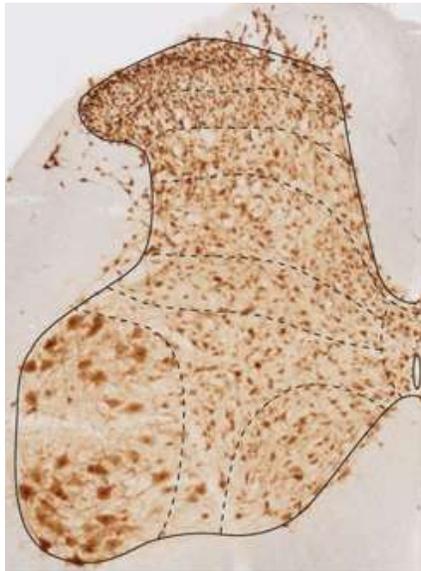
Las interneuronas colaboran en el establecimiento de un complejo circuito espinal local que involucra a otras interneuronas, neuronas de proyección y las terminales aferentes primarias. Por tal motivo, presentan dendritas y axones con diferentes características, que se extienden dentro de la misma lámina o se interconectan con otras láminas dentro del mismo segmento espinal. Morfológicamente, las interneuronas son descritas como células en islote, centrales, radiales o verticales [98] y según su neuroquímica se pueden clasificar en 2 grupos: excitatorias e inhibitorias.

Las **interneuronas excitatorias** son un grupo de neuronas heterogéneas que se desarrollan bajo el control de distintos factores de transcripción [99, 100]. En muchos casos, la expresión del transportador *vesicular de glutamato 2 (VGLUT2)* confirma el perfil excitatorio de muchas de ellas [101, 102]. Sin embargo, además del glutamato, se ha determinado la existencia de diversas subpoblaciones de interneuronas excitatorias gracias a la presencia de otros marcadores neuroquímicos que incluyen a la *proteína quinasa C gamma (PKC γ)* (Figura I.2B) [103], al *receptor opioide mu (MOR)* [104-106], la neurotensina [107], la somatostatina [108], y la neuroquinina B [109].

Figura I.2 Organización laminar del asta dorsal y el ingreso de las aferencias primarias. (A) Sección transversal de la médula espinal lumbar de la rata que presenta una inmunotinción con el anticuerpo NeuN, que específicamente marca neuronas. Las láminas se encuentran separadas por líneas punteadas. Las láminas I y II constituyen el asta dorsal superficial, y se caracterizan por presentar numerosas neuronas pequeñas. La lámina II se divide en externa (LIIe) e interna (LIIi). La LIIi presenta una menor densidad neuronal. Las aferencias primarias presentan un patrón de terminación laminar basado en el diámetro de las fibras y una distribución somatotópica según la funcionalidad. Se muestran las terminaciones centrales de los principales tipos de aferencias primarias (excluyendo los propioceptores). Las aferencias A β táctiles o provenientes del pelo finalizan principalmente en las láminas III – VI, con alguna extensión a la lámina IIi. Su distribución precisa depende de su función. Las fibras A δ provenientes del folículo piloso arborizan en ambos bordes de las láminas II/III, mientras que las fibras A δ proveniente de nociceptores finalizan principalmente en la lámina I, con algunas ramificaciones hacia las láminas V y X. Las aferencias primarias peptidérgicas (que también incluyen a algunas fibras A δ nociceptivas) arborizan principalmente en la lámina I e IIe. Algunas de sus fibras penetran más profundamente, mientras que la mayoría de las fibras C no-peptidérgicas forman una banda que ocupa la porción central de la lámina II. (B) Las diferentes poblaciones de neuronas aferentes primarias finalizan en diferentes regiones del asta dorsal de la médula espinal. Las aferencias de nociceptores C y A δ se concentran en el asta dorsal superficial (Láminas I y II). Los peptidérgicos que expresan TRPV1 finalizan en las láminas I y IIe y las no peptidérgicas en la LIIi. Los nociceptores A δ finalizan en las láminas I y V. Esta figura también incluye la población de interneuronas que expresan PKC γ que han sido implicadas en la alodinia mecánica inducida por una injuria nerviosa provocada por una estimulación de aferencias de tamaño grande (A β). Figura adaptada de [77].

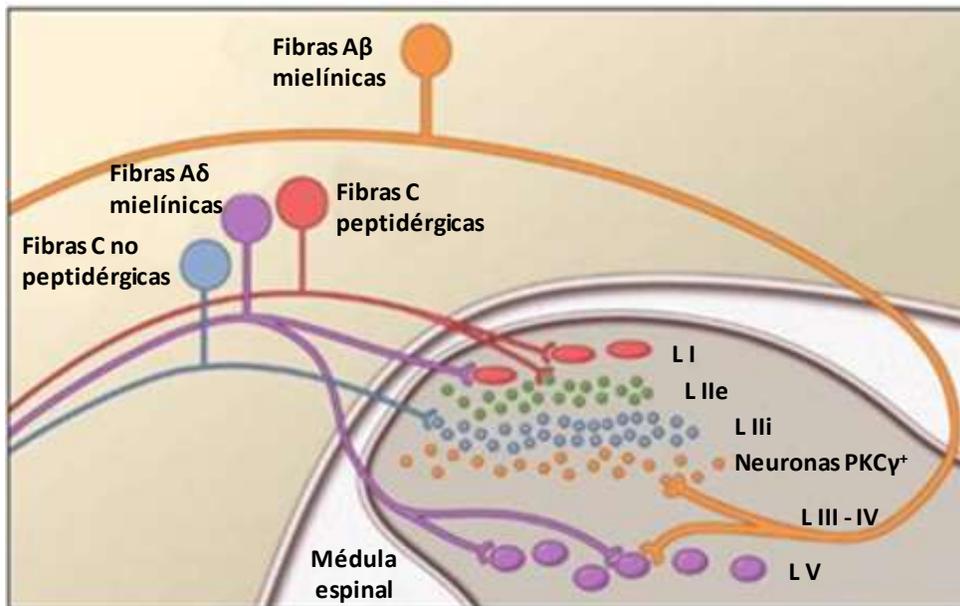
Figure I.2 Laminar organisation of the dorsal horn and primary afferent inputs. (A) A transverse section of rat mid-lumbar spinal cord that is immunostained using an antibody (NeuN) that specifically labels neurons. Laminar boundaries are indicated by the dashed lines. Laminae I and II constitute the superficial dorsal horn, and are characterised by the presence of numerous small neurons. Lamina II can be divided into outer (IIo) and inner (IIi) parts, with the latter having a somewhat lower density of neurons. Primary afferents present a laminar termination pattern based on fibre diameter. The central terminations of the major primary afferent types (excluding proprioceptors) are shown. A β tactile and hair afferents end mainly in laminae III-VI with some extension into lamina IIi, the precise arrangement depending on their function. A δ hair-follicle afferents arborise on either side of the lamina II/III border, whereas A δ nociceptors end mainly in lamina I, with some giving branches to laminae V and X. Peptidergic primary afferents (which also include some A δ nociceptors) arborise mainly in lamina I and IIo, with some fibres penetrating more deeply, whereas most non-peptidergic C fibres form a band that occupies the central part of lamina II. (B) The different populations of primary afferent fibers target different regions of the dorsal horn of the spinal cord, with the input from C and A δ nociceptors concentrated in the superficial dorsal horn (laminae I and II). The peptidergic, TRPV1-expressing subset of nociceptors targets laminae I and outer II and the nonpeptidergic subset targets inner lamina II. A δ nociceptors target both laminae I and V. This figure also includes the PKC γ -expressing population of interneurons that have been implicated in nerve injury-evoked mechanical allodynia provoked by stimulation of large diameter (A β) afferents. Figure adapted from [77].

A



FIBRA	LÁMINA
Nociceptores A δ	I
Peptidérgicas A δ /C	I / IIe
No peptidérgicas C	II
Folículo piloso A δ	III / III
Piel / pelo A β	III / V

B



En cambio, las **interneuronas inhibitorias** utilizan el GABA y/o glicina como su principal neurotransmisor/es. En la rata, el GABA se encuentra presente en alrededor de 25%, 30% y 40% de las neuronas de las láminas I, II y III respectivamente [110]. Igualmente, estudios de doble marcación han identificado subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas que expresan el *neuropéptido tirosina (NPY)*, *galanina (GAL)*, *parvalbúmina (PV)* o la *óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn)*. Estas poblaciones no se superponen y conforman ~65% de las interneuronas inhibitorias de la LI y ~50% de la LII [111].

Neuronas de proyección

Las **neuronas de proyección** son la vía final común espinal a través de la cual la información procesada a determinado nivel es remitida a áreas superiores del neuroeje. Muchas de ellas se encuentran en la lámina más superficial del asta dorsal (LI) y aquí, la mayoría de las neuronas son específicamente nociceptivas. Por el contrario, el asta dorsal profunda (LV) contiene las llamadas neuronas de proyección de *rango dinámico amplio (WDR según sus siglas en inglés)* que responden tanto a estímulos nocivos como inocuos [112]. Curiosamente, a pesar de la importancia de las neuronas de proyección, ellas conforman una pequeña proporción de la población neuronal total de la médula espinal (por ejemplo, sólo un 5% de las neuronas de la lámina I son de proyección) [113].

Aunque el tálamo es el principal destino de las neuronas de proyección en los primates, la mayoría de las neuronas de proyección (~80%) de la LI en roedores finalizan en el *núcleo parabraquial (NP)* de la porción dorsolateral del tronco del encéfalo. A su vez, el NP provee un acceso rápido a estructuras límbicas como la

amígdala y el hipocampo, probablemente involucrados en dotar de emocionalidad al dolor. Otras neuronas de proyección se dirigen a la sustancia gris periacueductal, la formación reticular, el hipotálamo y el tálamo [114-116] y muchas otras colateralizan a otros múltiples sitios supraespinales [113, 117].

Con respecto a su neuroquímica [118], las neuronas de proyección no expresan GABA o glicina, interpretándose rápidamente que son exclusivamente excitatorias [119]. Asimismo, la mayor parte de las neuronas que proyectan al NP (~80%) expresan el receptor de la *neuroquinina 1 (NK1)*, receptor blanco de neuronas aferentes primarias [120] e interneuronas locales que sintetizan el neuropéptido excitatorio *sustancia P (SP)*.

Proyecciones descendentes

La actividad de interneuronas, neuronas de proyección y terminales aferentes a nivel espinal se encuentra regularmente sometida a control proveniente desde regiones troncoencefálicas bien definidas. Existen principalmente 2 vías descendentes monoaminérgicas que se proyectan al asta dorsal: 1) la vía serotoninérgica, originada mayoritariamente en el núcleo del rafe magno; y 2) la vía noradrenérgica, originada en el locus coeruleus y otras regiones pontinas. Los axones de ambas vías terminan de manera difusa en el asta dorsal. Otra vía descendente que probablemente presente un rol asociado a mecanismos del dolor, se encuentra conformada por axones GABAérgicos provenientes de la región rostral ventromedial del bulbo raquídeo [120]. Esta se arboriza en el asta dorsal [121] y hace sinapsis con interneuronas de la lámina II [122].

3. Neurotransmisores y receptores asociados a la transmisión del dolor – Respuesta frente a lesiones

A continuación serán descriptos algunos de los neurotransmisores, receptores y marcadores involucrados en la identificación de nociceptores y con funciones clave en nocicepción, estudiados en la presente tesis. Se incluirán: 1) el sistema glutamatérgico, dado que es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC; 2) el sistema neuropeptidérgico y su rol en la modulación de la actividad sináptica; se tratará en particular el CGRP y el NPY y sus receptores asociados, por ser específicamente analizados en la presente tesis; 3) el receptor de potencial transitorio V1 (*TRPV1 por sus siglas en inglés*), por su rol esencial en la transmisión del dolor; 4) la *isolectina B4 (IB4)*, un marcador clásico de neuronas aferentes primarias; y 5) la *tirosina hidroxilasa (TH)*, curiosamente expresada en neuronas de los GARDs.

3.1 Sistema glutamatérgico

Glutamato

El **glutamato** es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC y la gran mayoría de las neuronas aferentes primarias [123-125]. El glutamato participa en una amplia variedad de funciones del sistema nervioso, incluyendo el desarrollo, desde la migración neuronal, la diferenciación y la muerte hasta la formación y eliminación de sinapsis, en todos los casos en procesos dependientes del tipo de receptor glutamatérgico activado [126].

Las neuronas aferentes primarias utilizan glutamato como neurotransmisor principal [108, 127-129], y su presencia inmunohistoquímica se encuentra tanto a

nivel de los cuerpos celulares de dichas neuronas, así como en las raíces dorsales y los nervios periféricos [130]. En la rata, la presencia inmunoreactiva del glutamato ha sido demostrada en 70% de las neuronas de los GARDs y el ganglio trigeminal [131-136]. Además, las neuronas aferentes primarias están dotadas de varias enzimas participantes en la síntesis de glutamato. Estas son: 1) la enzima *glutaminasa (GLS)* (Figura I.3) que convierte la glutamina en glutamato; 2) el ciclo del ácido tricarboxílico para la conversión de glucosa en glutamato y 3) la enzima dipeptidasa acídica acoplada a la α -N-acetilada (NAALADasa) que hidroliza el neurotransmisor *N-acetil-aspartilglutamato (NAAG)* en glutamato y N-acetilaspártato [137]. A nivel espinal, prácticamente la totalidad de las interneuronas excitatorias dentro del asta dorsal son glutamatérgicas [108], así como también las conexiones del haz corticoespinal que terminan en el asta dorsal [138, 139].

La lesión de nervios periféricos induce un aumento del glutamato ganglionar [140] consistente con un movimiento anterógrado del glutamato hacia la periferia. También, los niveles funcionales de glutamato aumentan en la médula espinal de la rata durante el desarrollo de un proceso inflamatorio [141, 142], así como luego de lesiones de índole neuropático [143, 144]. Por tal motivo, la modulación de la actividad del sistema glutamatérgico es una estrategia atractiva para la potenciación del efecto analgésico inducido por los opioides en el dolor neuropático u otros fármacos como los antidepresivos [126].

Receptores glutamatérgicos

Existen dos tipos de receptores glutamatérgicos: **ionotrópicos** y **metabotrópicos**. Los receptores ionotrópicos son denominados en función del agonista farmacológico que se acopla a un subtipo específico de receptor y abre selectivamente el canal iónico asociado [145-147]. Estos son el *ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA)*, los receptores de kainato y el *N-metil-D-aspartato (NMDA)* (Figura I.3). Estos canales catiónicos se abren cuando se les acopla el glutamato que permite el paso selectivo de iones *sodio (Na^+)*, *potasio (K^+)* o *calcio (Ca^{++})*, produciendo despolarización de la neurona postsináptica [137]. Estos receptores juegan un rol crítico en la transmisión de señales nerviosas, inician cambios en la neuroplasticidad en el SNC y son responsables de muchos procesos patológicos, incluyendo el dolor crónico [126].

Los *receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs según sus siglas en inglés)*, no abren canales iónicos directamente, sino que desencadenan diversas cascadas intracelulares que modulan la función neuronal de diferentes maneras [148]. Se trata de una familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. Ocho subtipos de mGluRs han sido clonados y clasificados de la siguiente manera: grupo I (mGlu1 y mGlu5); grupo II (mGlu2 y mGlu3); y grupo III (mGlu4 y mGlu 6-8) [149-155].

La activación de los mGluRs presinápticos (grupos II (mGlu2 y mGlu3) y III (mGlu4 y mGlu6-8)), localizados en terminales nerviosas glutamatérgicas generan una disminución en la liberación del glutamato tanto *in vitro* [156] como *in vivo* [157]. Por ende, y al contrario de otros mGluRs y receptores ionotrópicos, la

estimulación de estos grupos podrían producir un antagonismo funcional en el sistema glutamatérgico [158] y esto podría aliviar el dolor.

Transportadores de glutamato

VGLUTs

Una vez sintetizado por las neuronas aferentes primarias, el glutamato es incorporado en vesículas sinápticas mediante los *transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs según sus siglas en inglés)* localizados en las membranas de las vesículas sinápticas (Figura I.3).

En 1994, Ni y sus colaboradores aislaron el *co-transportador de fosfato inorgánico dependiente de Na⁺ específico del cerebro (BNPI según sus siglas en inglés)*, una proteína “específica del cerebro” que presentaba similitudes con el transportador de fosfato inorgánico dependiente de Na⁺ [159]. Más tarde, dos estudios confirmaron que el BNPI era de hecho un transportador vesicular de glutamato y fue renombrado como el *transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1, según sus siglas en inglés)* [160, 161]. Curiosamente, se encontró que el VGLUT1 se expresa abundantemente en subpoblaciones neuronales de la corteza cerebral, el hipocampo y la corteza cerebelosa, en contraste con su muy poca expresión en regiones subcorticales. Esto sugirió que en estas estructuras subcorticales, el glutamato es empaquetado en vesículas por un segundo subtipo de transportado [159]

De hecho, en el año 2000, Aihara y colaboradores descubrieron otro miembro de los transportadores de fosfato inorgánico dependientes de Na⁺, nombrándolo *cotransportador de fosfato inorgánico dependiente de Na⁺ asociado a la*

diferenciación (DNPI según sus siglas en inglés) [162]. El DNPI mostró un alto grado de homología con el BNPI (VGLUT1), localizándose abundantemente en regiones subcorticales [162, 163]. En el año 2002, cinco grupos de investigación reportaron que el DNPI era también un transportador vesicular de glutamato y lo renombraron como VGLUT2 [164-168]. El VGLUT2, similar al VGLUT1 transloca glutamato dentro de las vesículas utilizando un gradiente de protón electroquímico [166] y se distribuye en terminales axónicas excitatorias que luego forman sinapsis asimétricas [166, 169]. Se concluyó de estas observaciones que los VGLUTs son marcadores genuinos de las sinapsis glutamatérgicas [170].

Finalmente, también en el 2002 se descubrió un tercer subtipo de transportador vesicular, el VGLUT3, que compartía todas las características estructurales y funcionales con los otros dos VGLUTs [171-173]. A diferencia de los transcritos de los VGLUT1 y VGLUT2, que se expresan ampliamente en las regiones corticales y subcorticales, respectivamente, la distribución del *ácido ribonucleico mensajero (ARNm)* del VGLUT3 se vio restringida a poblaciones neuronales que no habían sido previamente consideradas como glutamatérgicas. El VGLUT3 se encontró en neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe, en neuronas acetilcolinérgicas en el estriado ventral y dorsal y en subtipos de interneuronas (células en canasto) en la corteza cerebelosa y el hipocampo [172-175]. Además, el VGLUT3 también está presente en subgrupos de neuronas principalmente glutamatérgicas en el rafe, la habénula, el hipotálamo, los tubérculos olfatorios y células de la cóclea [172, 174, 176, 177].

Se han investigado las propiedades cinéticas de los VGLUTs utilizando vesículas sinápticas y vesículas aisladas de sistemas de expresión heterólogos. La

inhibición del transporte de glutamato por ionóforos demuestra que la principal fuerza que impulsa el transporte de glutamato por los VGLUTs es el potencial de membrana ($\Delta\psi$), aunque se ha reportado que existe una contribución significativa del gradiente de protones H^+ (ΔpH) [160, 164-166, 168, 172, 178, 179]. Esta aparente afinidad por el glutamato es de alrededor de 15 mM, que es consistente con las altas concentraciones de glutamato citoplasmático [160, 164-166, 168, 172, 178, 180].

La especificidad por un sustrato de los VGLUTs se limita estrictamente al glutamato; los VGLUTs no reconocen aspartato, glutamina o GABA [178, 181]. Otra característica de los VGLUTs es su dependencia absoluta del *cloro* (Cl^-) y el Cl^- bifásico [160, 164, 168, 178, 179]. De hecho, a bajas concentraciones de Cl^- , el transporte de glutamato es despreciable y a concentraciones de Cl^- más elevadas el transporte se activa. La actividad máxima se alcanza a los ~ 4 mM. A concentraciones mayores, el transporte decrece gradualmente [182].

Finalmente, mediante estudios practicados en ratones *knockout* (*KO*), se ha confirmado la importancia funcional de los VGLUTs [177, 183-187]. Así, tales ratones nacen con trastornos neurológicos progresivos como ceguera e incoordinación [183, 184, 186]. Como es esperable, las vesículas sinápticas aisladas de estos ratones presentan una disminución de la incorporación del glutamato. Por otro lado, la inactivación genética del VGLUT2 causa la muerte perinatal consistente con la expresión predominante del VGLUT2 durante el desarrollo embrionario y estadios postnatales tempranos [185, 188]. Además, recientemente se observó que la disrupción genética del VGLUT3 revela el involucramiento del VGLUT3 en funciones auditivas y la hipersensibilidad mecánica [177, 187]. Además, se conoce

que la lesión de un nervio periférico altera la expresión de los VGLUTs en la neurona aferente primaria (esto se desarrollará en la sección de Resultados y Discusión).

EEATs

Los *transportadores de aminoácidos excitatorios* (EAAT según sus siglas en inglés), también conocidos como transportadores de glutamato, se expresan en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares y entre sus principales funciones está el mantener la homeostasis del glutamato en el sistema nervioso. Se han identificado cinco transportadores de glutamato, de los cuales el EAAT3 se encuentra en las neuronas [146, 189, 190], mientras que el EAAT1 (transportador de glutamato/aspartato) y el EAAT2 se expresan en células gliales (Figura I.3). Más específicamente, el EAAT3 se expresa principalmente en compartimentos citoplasmáticos de los axones y de las prolongaciones centrales de las neuronas de los GARDs de la rata. También se encuentra en la capa de mielina más cercana al axón del nervio ciático [191, 192].

Estos transportadores contribuyen tanto a la recaptación del glutamato para su reutilización neuronal, como a la remoción del ambiente sináptico. En relación a este último caso, el aumento de la actividad sináptica puede aumentar rápidamente las concentraciones del glutamato en la hendidura sináptica, que de alcanzar niveles excesivos podrían convertirse en tóxicos [193]. En esta situación, el parámetro clave en el mecanismo de despeje del glutamato es más bien la difusión del glutamato fuera de la hendidura sináptica más que su recaptación [194]. Este proceso es acelerado por el acople y la translocación del glutamato por

transportadores que se expresan en astrocitos cercanos a la hendidura sináptica [195].

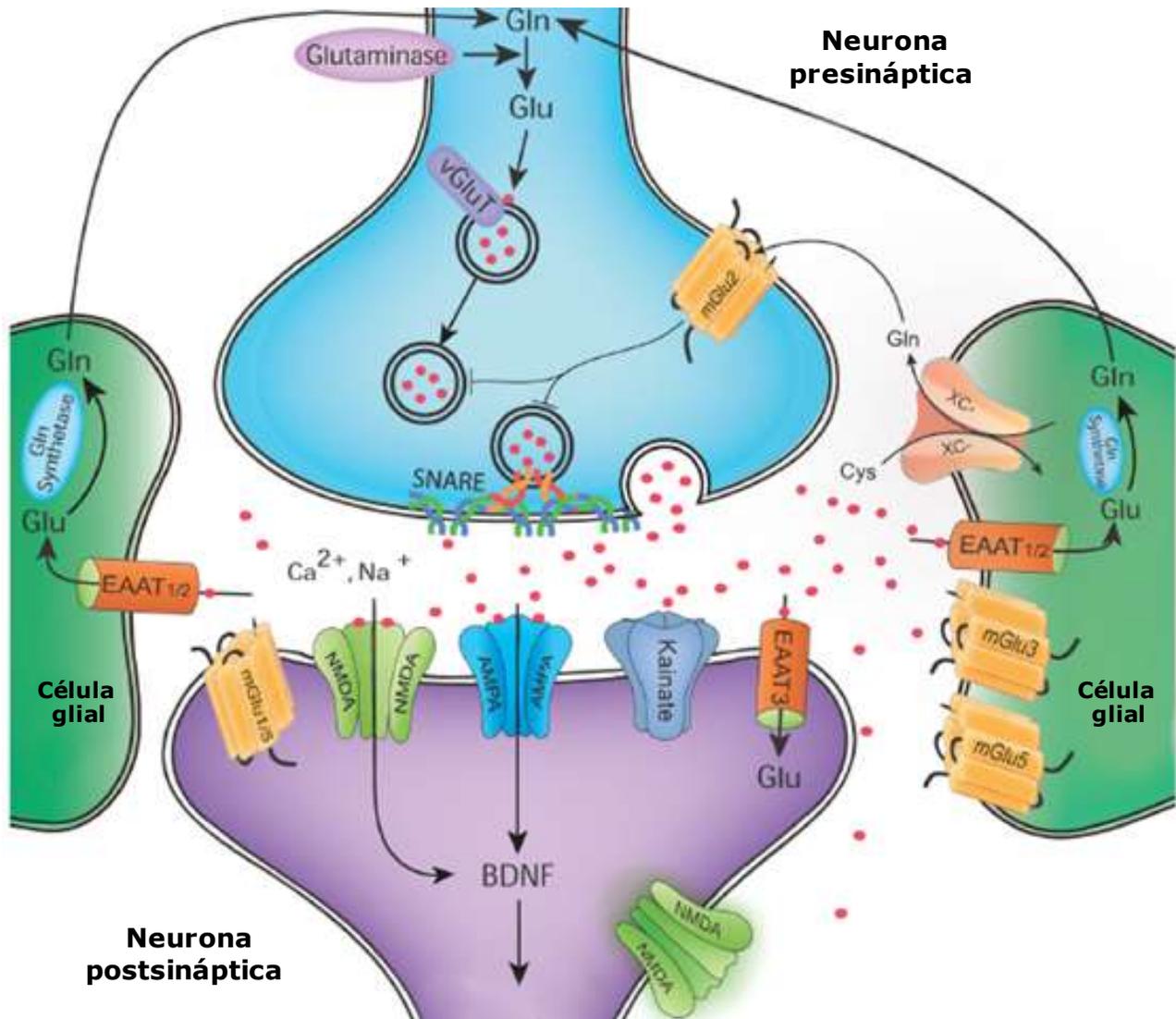
La lesión de un nervio periférico induce disminución en la expresión los EEATs, que se manifiesta por una disminución neta de la recaptación del glutamato [196-198]. Esto conlleva a un aumento sostenido de su concentración en la hendidura sináptica y, por ende, contribuye a una señalización aberrante glutamatérgica en neuronas de los GARDs [199]. Esto genera una magnificación de las señales excitatorias desde las neuronas aferentes primarias hacia las neuronas post sinápticas del asta dorsal, contribuyendo al desarrollo de la nocicepción aberrante [199].

Figura I.3. Esquema que describe la estructura básica de la sinápsis glutamérgica.

Debido al riesgo de daño excitotóxico que existe en el caso que se produzca una estimulación glutamatergica excesiva, se debe mantener un equilibrio de los niveles de glutamato en el SNC. La glutamina (Gln) es convertida en glutamato (Glu) por medio de la glutaminasa. El Glu es empaquetado en vesículas presinápticas por el transportador vesicular de Glu (VGLUT) y luego liberado en el espacio sináptico por mecanismos voltaje-dependientes, a través de interacciones vesiculares con las proteínas SNARE. El Glu que es liberado en la hendidura sináptica es reciclado del espacio extracelular por medio de los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs), que se expresan predominantemente en la glia. Allí, el Glu es convertido en Gln mediante la Gln sintetasa y exportado al espacio extracelular para luego ser recaptado por las neuronas. Además, el sistema de cotransporte cistina/glutamato de la glia, también contribuye al reciclado del Glu. Los receptores glutamatergicos están presentes en neuronas presinápticas y postsinápticas, así como también en células gliales. Estos incluyen a los receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA/KA) y metabotrópicos (mGluRs). El efecto que induce el Glu es determinado por el subtipo de receptor al que se acopla, la localización del receptor (sináptico, perisináptico y extrasináptico) y las interacciones con diversas proteínas (no mostrado) en la postsinapsis. (Figura adaptada de [200]).

Figure I.3. Schematic drawing showing the basic structure of a glutamatergic synapse.

Due to the risk of excitotoxic damage in the wake of excessive glutamatergic stimulation, precise physiological control of glutamate must be maintained in the mammalian CNS. Glutamine (Gln) is converted to glutamate (Glu) by glutaminase. Glu is packaged into presynaptic vesicles by vesicular Glu transporter (VGLUT) and synaptically released in an voltage-dependent manner through vesicular interactions with SNARE proteins. Synaptically-released Glu is recycled from the extracellular space by excitatory amino acid transporters (EAATs) expressed predominantly on glia. In astrocytes, Glu is converted to Gln by Gln synthetase and exported extracellularly to be taken up again by neurons. Additionally, system x-C is a cystine/glutamate antiporter expressed on glia that also contributes to Glu recycling. Glu receptors are present on presynaptic and postsynaptic neurons as well as on glial cells. These include both ionotropic receptors (NMDA, AMPA/KA) and metabotropic receptors (mGluRs). The effect of Glu is determined by the receptor subtype, localization (synaptic, perisynaptic and extrasynaptic), and interactions with various scaffolding and signaling proteins (not shown) in the postsynaptic density. (Figure adapted from [200]).



3.2 Sistema Neuropeptidérgico

CGRP

El CGRP es un péptido de 37 aminoácidos, que está localizado principalmente en neuronas nociceptivas de los GARDs, productoras de fibras sensitivas C y Aδ [201, 202]. Junto con otro neuropéptido, la sustancia P, son considerados neurotransmisores claves en la señalización del dolor neuropático [203]. Se ha observado que la axotomía [204, 205], la compresión crónica [206, 207] y la lesión parcial del nervio ciático [206] disminuyen la expresión de la proteína y el transcripto del CGRP en neuronas aferentes primarias no-viscerales. El CGRP también es un neuropéptido abundante en las neuronas de los GARDs viscerales [39], aunque se conocen mucho menos los cambios en su expresión luego de la lesión de nervios viscerales periféricos (ver Resultados de esta tesis para observaciones recientes).

Se ha demostrado que el CGRP posee un rol relevante bajo condiciones de dolor anormal como ocurre en estados de dolor neuropático o inflamatorios. Así, antagonistas del CGRP inhiben la hiperalgesia inducida por la inyección intraplantar de sustancias proinflamatorias como la capsaicina y la carragenina en ratas, y disminuyen el dolor en modelos de dolor neuropático [208-210]. Finalmente, se ha observado que ratones KO para CGRP sometidos a inflamación plantar inducida por carragenina no desarrollan hiperalgesia [211]. Sumado a esto, estudios electrofisiológicos en las ratas han demostrado la importancia del CGRP en la hiperexcitabilidad de neuronas de la médula espinal en condiciones de inflamación articular [212].

NPY

El NPY es un péptido de 36 aminoácidos originalmente descrito por Tatemoto y colaboradores [213]. Se halla ampliamente distribuido en el SNC y SNP, y está ampliamente conservado a lo largo de la evolución [214]. El NPY se acopla a al menos cinco receptores distintos (receptores Y1 – Y5). Los receptores Y1 e Y2 parecen ser los más prevalentes en la transmisión del dolor, siendo su unión a NPY conducente a la activación de proteínas G que resultan en la inactivación de la adenilato ciclasa [215-219] o en el aumento de la actividad de la *proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK según sus siglas en inglés)* [220], respectivamente. Sin embargo, los receptores de NPY también influyen las concentraciones de calcio intracelular, ya sea por modulación de las vías del inositol 1,4,5 – trifosfato [Ins(1,4,5)P3 (IP3)] [215, 221] o por activación o inhibición de los canales de Ca⁺⁺ presentes en la membrana plasmática [215-220, 222].

En los GARDs, el receptor Y1 se expresa preponderantemente en neuronas aferentes primarias pequeñas (~20%). Estas neuronas, en la rata, expresan CGRP, por lo cual pertenecen al grupo de neuronas peptidérgicas [223]. El receptor Y2 se expresa en neuronas pequeñas (~15%), medianas y grandes. Se distinguen dos subpoblaciones del receptor Y2, dependiente de la localización subcelular de la proteína del receptor: 1) una localización citoplasmática de aspecto granular que coexpresa CGRP y 2) una localización acoplada a la membrana plasmática que no coexpresa CGRP. Ambos receptores (Y1 e Y2) son transportados hacia las terminales sinápticas centrales y periféricas de estas neuronas, sugiriendo su acción en la secreción presináptica de neurotransmisores [224-227]. Por otro lado, en la médula espinal, diferentes tipos de neuronas expresan el Y1R, incluyendo

interneuronas y neuronas de proyección, estas últimas potencialmente encargadas de transmitir impulsos dolorosos hacia el tronco del encéfalo y el cerebro [227, 228]. El Y2R, por su parte, estaría ausente en neuronas espinales [226]. En suma, pese a que por más de dos décadas se asumió que el receptor Y1 era exclusivamente postsináptico, mientras se entendía que el receptor Y2 era presináptico a nivel espinal [229], varios estudios morfológicos y electrofisiológicos confirman la presencia del Y1R tanto a nivel pre- y postsináptico, mientras que confirman la presencia exclusivamente presináptica del Y2R [230]

Generalmente se acepta que el NPY ejerce un efecto inhibitorio cuando actúa en neuronas que expresan el receptor Y1, mientras que cuando se acopla al receptor Y2 la excitabilidad neuronal aumenta. Sin embargo, cuando se trata de las terminales centrales de neuronas aferentes primarias, el receptor Y2 también ejerce un efecto inhibitorio, actuando como receptor presináptico (es decir, expresado en las terminales de fibras aferentes primarias) y reduciendo la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato [231, 232].

La axotomía u otros tipos de lesiones del nervio ciático [233], generan un aumento dramático en la expresión de los transcritos y las proteínas del NPY. Esto por lo general ocurre en neuronas medianas y/o grandes de los GARDs de los roedores, y resulta en un marcado aumento de las neuronas aferentes primarias positivas para el NPY, extendiéndose a las láminas profundas del asta dorsal [234], y por ende un aumento de la liberación espinal del NPY [235]. Por el contrario, en las neuronas de los GARDs de los monos solo se observa un aumento modesto del ARNm del NPY luego de la axotomía, sin presentar cambios en la inervación del NPY en el asta dorsal [236]. La expresión de los receptores del NPY en las neuronas de

los GARDs también se ve afectada por la lesión nerviosa. Así, transcripto y la proteína del receptor Y1 disminuyen su expresión en neuronas pequeñas de los GARDs de la rata [223, 237, 238], mientras que se observa un aumento del receptor Y2 en la rata [238, 239] y el mono [249]. Sin embargo, estos cambios son modestos en el ratón [226, 240, 241]. Esto sugiere que existen diferencias en la manera que los receptores del NPY reaccionan frente a la lesión de un nervio. Por otro lado, se han observado modestos o ningún cambio en la expresión del receptor Y1 en la médula espinal de la rata y el ratón, luego de la lesión de un nervio periférico [237]. La proteína del receptor Y2 tampoco parece presentar modificaciones en su expresión [226]. Sin embargo, se ha descrito un aumento o disminución del acople del NPY en el asta dorsal ipsilateral de una axotomía del nervio ciático en la rata y el mono, respectivamente [242, 243].

Finalmente, la inflamación de la pata posterior de la rata induce un aumento del ARNm del receptor Y1 en las neuronas de los GARDs, mientras que la expresión del NPY no se ve afectada [244, 245]. Por el contrario, los niveles de los transcriptos y proteínas del receptor Y1 y el NPY aumentan en el asta dorsal [245]. El rol del receptor Y2 en el dolor inflamatorio a nivel espinal todavía no ha sido explorado, pero pareciera ser menos relevante que el del receptor Y1 [246].

TRPV1

El TRPV1 fue identificado por primera vez por su respuesta frente a la estimulación con **capsaicina** (un vaniloide derivado del ají picante) que genera una sensación quemante. Más tarde, se observó que el TRPV1 también responde ante la presencia de calor nocivo, con un umbral de activación de alrededor de 43°C [247].

También hay estudios que demuestran que el TRPV1 se encuentra involucrado en la homeostasis térmica corporal. Se observó en algunos ensayos clínicos que los antagonistas del TRPV1 generan un aumento de la temperatura corporal de varios grados [248, 249]. Ahora es claro que la administración de un antagonista del TRPV1 genera una respuesta hipotérmica en varias especies [250]. Además se observó, en ratones KO para el TRPV1, una disminución significativa en el consumo de agua en comparación de ratones control, lo que sugiere que el TRPV1 participa en la generación de la sed [251]. Por último, se ha observado que el TRPV1 se activa con moléculas lipídicas endógenas como la anandamida [252] y se sensibiliza en presencia de protones. Esto último podría ser relevante en procesos inflamatorios donde el pH extracelular se encuentra disminuido [253].

Los análisis inmunohistoquímicos muestran que el TRPV1 se expresa en aproximadamente 30–50% de las neuronas sensitivas de roedores, preferentemente en nociceptores peptidérgicos productores de fibras tipo C [254]. Varios trabajos han mostrado la fuerte asociación entre el TRPV1 y el dolor por inflamación. Se observa que los antagonistas del TRPV1 inhiben la hipersensibilidad térmica y/o mecánica asociada a múltiples modelos de inflamación como por ejemplo el dolor inducido por el *adyuvante completo de Freund (CFA según sus siglas en inglés)* [255, 256].

3.3 Otros marcadores asociados a neuronas de los GARDS

IB4

Una manera de clasificar las neuronas nociceptivas es diferenciarlas en 2 subgrupos o subpoblaciones en función de sus propiedades neuroquímicas. Un

grupo es dependiente del factor de crecimiento nervioso, expresa el receptor tirosina quinasa A y contiene neuropéptidos como la SP y el CGRP. Por tal motivo se las denomina **neuronas peptidérgicas** [56]. El otro grupo (**no peptidérgico**) es dependiente de factores de crecimiento que pertenecen a la familia de factores neurotróficos derivados de células gliales, carece de neuropéptidos y expresa sitios de unión para la IB4 [257, 258]. En el sistema sensitivo visceral la mayoría de las aferencias (70 – 90%) son peptidérgicas y solo una minoría sintetizan IB4 [39].

La distinción arriba mencionada tiene también un correlato funcional. Así, se sabe que las neuronas aferentes peptidérgicas contribuyen en la inflamación neurogénica [259] y en la sensibilización central [260]. También se ha demostrado, mediante el uso de un conjugado de IB4 con la toxina saporina (mediante esta estrategia, son eliminadas neuronas aferentes positivas para IB4), que las neuronas aferentes no peptidérgicas IB4 participan en la nocicepción. Así, se determinó que las neuronas aferentes IB4 contribuyen no solo a respuestas nociceptivas basales frente a estímulos cutáneos térmicos y mecánicos nocivos [261], sino también a la hiperalgesia inducida por inflamación, neuropatías y cáncer [262-265].

TH

La *TH* es la enzima limitante en la síntesis noradrenérgica, y está ampliamente expresada en neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas en el SNC [266]. También se expresa en neuronas simpáticas periféricas y neuronas entéricas del intestino [267, 268]. Varios estudios inmunohistoquímicos [269-275], de hibridación *in situ* [270] y más recientemente, estudios de secuenciación a gran escala del ARN de una célula [276] han documentado que una proporción de las

neuronas pequeñas y algunas medianas de los GARDs de roedores adultos también expresan la TH. Tal presencia también se extiende a neuronas viscerales de mediano tamaño de los GARDs de ratones [269, 277] o transitoriamente a neuronas de tamaño grande de los GARDs durante la vida prenatal [278].

La expresión de la TH en neuronas aferentes primarias se ve afectada luego de la lesión de un nervio periférico. Esto se observó por primera vez en los ganglios nodoso y petroso luego de la axotomía del nervio vago o sus ramas, resultando en una disminución en el porcentaje de neuronas que expresan TH [271, 279, 280] y de la actividad catalítica de la TH [281]. Más recientemente, se observó que la axotomía del nervio ciático [270] o la ligadura de un nervio espinal [282] resultan también en una disminución en la expresión del ARNm de la TH [270] y/o de la proteína [270] en los GARDs de ratones. Asimismo, en la rata, la compresión crónica del nervio ciático conduce a la disminución del ARNm de la TH en los GARDs L4 – 5 [283].

4. Dolor

4.1 Dolor nociceptivo vs. dolor neuropático

El dolor nociceptivo, según la IASP, se define como “dolor que surge de un daño actual o potencial a los tejidos no neurales y se debe a la activación de los nociceptores” [284]. El dolor nociceptivo es un mecanismo de advertencia esencial para el organismo [285, 286]. Un ejemplo del dolor nociceptivo incluye al dolor postoperatorio que es de comienzo agudo y de relativa corta duración [287-291].

Conociendo ya la neuroanatomía básica del sistema somatosensorial, es ahora fácil comprender la vía neuronal que conlleva a la transmisión del dolor. Así,

la activación de los nociceptores se transduce a lo largo de los axones de las neuronas aferentes primarias que finalizan en el asta dorsal de la médula espinal. Allí, la información dolorosa hace relevo y mediante el haz espinotalámico llega al tálamo [292]. En el tálamo, las vías nociceptivas hacen contacto sináptico con los núcleos ventroposterolateral y ventroposteromedial [293]. Desde estos núcleos, la información nociceptiva es transmitida a diversas regiones corticales, como el lóbulo de la ínsula, la corteza del cíngulo y regiones subcorticales incluyendo la amígdala, el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, ganglios de la base y áreas de la corteza cerebral [294].

Al contrario del dolor nociceptivo, cuando el dolor se intensifica anormalmente o persiste por períodos prolongados es considerado patológico [295]. El dolor crónico afecta al 20-30% de la población general [296] y estudios epidemiológicos recientes muestran que la incidencia del dolor crónico es altísima, aún cuando se la compara con otras enfermedades importantes como la diabetes, el cáncer o las coronariopatías [297].

En un porcentaje significativo de pacientes, el dolor crónico se debe a lesiones directas o por enfermedades del sistema nervioso somatosensorial siendo definido como **dolor neuropático** [298]. El dolor neuropático es causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial y puede ocurrir en la periferia (neuropatías compresivas) o en el SNC (accidente cerebrovascular) (Tabla I.1) [299]. Las causas más estudiadas y comprendidas son las neuropatías asociadas a diabetes mellitus y el herpes zoster [300], pero existen muchas otras causas clínicamente importantes como es el dolor asociado a enfermedades oncológicas, lesiones de la médula espinal, dolor asociado a miembro fantasma

[301], radiculopatías [257], síndrome de dolor regional complejo, dolor asociado a accidentes cerebrovasculares, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y otras neuropatías periféricas [302]. El dolor neuropático puede ser clasificado en periférico o central en términos de la localización de la lesión o la enfermedad, siendo esta distinción importante respecto de las manifestaciones clínicas y mecanismos fisiopatológicos subyacentes (Tabla I.1)[303, 304].

Finalmente, otra forma de dolor nociceptivo es el dolor inflamatorio, que puede ser agudo y auto-limitado, o cronificarse, como es el caso de la osteoartritis, la artritis reumatoidea o patologías más raras y con componente inflamatorio como el síndrome de dolor complejo regional [305-307].

Tabla I.1 Clasificación del dolor neuropático basado en la enfermedad y en la anatomía. (Tabla adaptada de [303]).

Table I.1 Disease-based and anatomy-based classification of neuropathic pain. (Table adapted from [303]).

Neuropatías periféricas

Focal, multifocal

Dolor en miembro fantasma, dolor por transección de un nervio (parcial o completa), neuroma (post-traumático o postoperatorio), neuralgia post-traumática, síndromes de atrapamiento, mastectomía, post-toracotomía, neuralgia de Morton, cicatrices dolorosas, herpes zoster y neuralgia post herpética, mononeuropatía diabética, amiotrofia diabética, neuropatía isquémica, borreliosis, enfermedades del tejido conectivo (vasculitis), neuralgia amiotrófica, tumores de nervios periféricos, plexopatía por radiación, neuritis de los plexos (idiopática o hereditaria), neuralgia del trigémino o glossofaríngeo, síndromes de compresión vascular

Neuropatías generalizadas (polineuropatías)

Metabólicas o nutricionales

Diabetes, alcoholismo, amiloidosis, hipotiroidismo, beri beri, pelagra

Asociadas al uso de fármacos

Antirretrovirales, cisplatino, oxaliplatino, disulfiram, etambutol, isoniazida, nitrofurantoína, talidomida, metiltiouracilo, vincristina, cloranfenicol, metronidazol, taxoides, oro

Asociadas a toxinas

Acrilamida, arsénico, clioquinol, dinitrofenol, óxido de etileno, pentaclorofenol, talio

Hereditarias

Neuropatía amiloidea, enfermedad de Fabry, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 5, 2B, neuropatías sensitivas hereditarias y neuropatías autonómicas tipo 1 y tipo 1B

Malignas

Neuropatía periférica paraneoplásica asociada a un carcinoma, mieloma

Infeciosa o post infecciosa

Polirradiculoneuropatías inmunes agudas o inflamatorias (síndrome de Guillain-Barré), borreliosis, VIH

Otras polineuropatías

Eritromelalgia, neuropatías de fibras pequeñas idiopática, pie de trinchera (lesión por frío)

Síndromes de dolor central

- Lesiones encefálicas vasculares (particularmente en el tronco del encéfalo y el tálamo), infartos, hemorragias, malformaciones vasculares
- Esclerosis múltiple
- Lesión traumática de la médula espinal, incluyendo la cordotomía itrogénica
- Lesión encefálica traumática
- Siringomielia y siringobulbia
- Tumores
- Absesos
- Enfermedades inflamatorias fuera de la esclerosis múltiple; mielitis virales, sífilis
- Epilepsia
- Enfermedad de Parkinson

Desórdenes neuropáticos dolorosos complejos

Síndromes de dolor regional complejo tipo I y II (distrofia simpática refleja)

Síndromes de dolor mixto

Dolor crónico de espalda baja con radiculopatía, dolor oncológico con invasión maligna de un plexo, síndrome de dolor regional complejo

4.2 Estudio del paciente con dolor neuropático

Signos y síntomas

Los pacientes con dolor neuropático presentan por lo general áreas de sensaciones anormales o de hipersensibilidad en la zona afectada. Se pueden distinguir 2 tipos de hipersensibilidad. En primer lugar la **alodinia**, que se define como una respuesta dolorosa frente a un estímulo normalmente inocuo [308]. En los casos de alodinia mecánica, inclusive un estímulo mecánico suave puede provocar dolor severo (por ejemplo, el vestirse). En segundo lugar, la **hiperalgesia** se define como un aumento en la sensibilidad al dolor frente estímulos nociceptivos [303]. Cabe aclarar que estas dos modalidades de dolor también son observadas en modelos animales (ver más abajo).

En la tabla I.2 se describen las definiciones y evaluaciones de los síntomas positivos y negativos en pacientes con dolor neuropático.

Evaluación

El patrón de distribución anatómico de los nervios afectados provee información valiosa para el diagnóstico diferencial de las posibles causas del dolor neuropático. Es por eso que también se clasifica a las neuropatías en polineuropatías simétricas generalizadas (enfermedades que afectan simultáneamente a varios nervios) y neuropatías asimétricas con una distribución focal o multifocal o procesos que afectan a los plexos braquial o lumbosacro.

Tabla I.2. Definición y evaluación de los signos y síntomas sensitivos positivos y negativos en pacientes con dolor neuropático (Tabla adaptada de [303]).

Table I.2. Definition and assessment of negative and positive sensory symptoms and signs in patients with neuropathic pain (Table adapted from [303]).

	Definición	Evaluación	Respuesta patológica esperada
Signos y síntomas negativos			
Hipoestesia	Disminución de la sensibilidad a estímulos no nocivos	Tocar la piel con un pincel, algodón o gasa	Disminución de la percepción, adormecimiento
Pal-hipoestesia	Disminución de la sensibilidad a la vibración	Colocar diapasón en un hueso o articulación	Disminución en el umbral de percepción
Hipoalgesia	Disminución de la sensibilidad a estímulos dolorosos	Pinchar la piel por única vez con un estímulo puntiagudo	Disminución de la percepción, adormecimiento
Hipoestesia térmica	Disminución de la sensibilidad a estímulos fríos o calientes	Contactar la piel con objetos a 10°C (metal, vaso con agua, acetona); contactar la piel con objetos a 45°C (metal, vaso con agua)	Disminución de la percepción
Sensaciones espontáneas o dolor			
Parestesia	Sensación continua no dolorosa	Grados de intensidad (0 – 10); area en cm ²	---
Dolor paroxístico	Sensación de electricidad de varios segundos	Cantidad de veces por tiempo; grados de intensidad (0 – 10)	---
Dolor superficial	Sensación continua de dolor, por lo general quemante	Grados de intensidad (0 – 10); area en cm ²	---
Dolor evocado			
Alodinia mecánica dinámica	Respuesta dolorosa frente a un estímulo no doloroso	Acariciar la piel con un pincel, algodón o gasa	Dolor superficial agudo y quemante. Se presenta en al area afectada principalmente pero se propaga a areas de piel no afectadas (zona secundaria)
Hiperalgnesia mecánica estática	Dolor frente a un estímulo normalmente no doloroso como una presión ligera.	Aplicar una ligera presión mecánica manual sobre la piel	Dolor sordo presente en el area afectada (dañada o sensibilizada)
Hiperalgnesia mecánica puntiforme	Dolor frente a un estímulo punzante no doloroso	Punzar la piel con un elemento punzante	Dolor superficial agudo. Se presenta en al area afectada principalmente pero se propaga a areas de piel no afectadas (zona secundaria)
Hiperalgnesia al frío	Dolor frente a un estímulo frío no doloroso	Contactar la piel con objetos a 20°C (metal, vaso con agua, acetona); control: contactar la piel con objetos que presenten la temperatura de la piel	Dolor, usualmente quemante, presente en el area afectada (dañada o sensibilizada)
Hiperalgnesia al calor	Dolor frente a un estímulo caliente no doloroso	Contactar la piel con objetos a 40°C (metal, vaso con agua, acetona); control: contactar la piel con objetos que presenten la temperatura de la piel	Dolor, usualmente quemante, presente en el area afectada (dañada o sensibilizada)
Hiperalgnesia mecánica somática profunda	Dolor frente a una presión normalmente no dolorosa en tejidos somáticos profundos	Aplicar presión manual ligera en músculos o articulaciones	Dolor profundo en músculos o articulaciones

Existen síntomas somatosensitivos negativos (déficit funcional) de dolor neuropático, que son molestos pero no dolorosos, como por ejemplo las parestesias (sensación de hormigueo o cosquilleo). Por otro lado, los síntomas dolorosos positivos pueden ser espontáneos o evocados. Entre los espontáneos (no inducidos por un estímulo y continuos), se encuentra la sensación de electricidad en la región afectada. Entre los síntomas evocados (dolor inducido por estímulos, hipersensibilidad), se encuentra la hipersensibilidad o la alodinia mecánica, seguida por hipersensibilidad o alodinia al frío y al calor. Por ejemplo, pacientes con alodinia mecánica expresan dolor severo frente a un estímulo mecánico suave como por ejemplo el roce de la ropa [309-311].

La evaluación clínica debe enfocarse en descartar patologías tratables (ej: compresión de la médula espinal y neoplasia), confirmar el diagnóstico de dolor neuropático e identificar características clínicas (insomnio y neuropatía autonómica) que podrían ayudar a individualizar el tratamiento. Así como con otras patologías de dolor crónico, la evaluación de la sospecha de dolor neuropático debe incluir una evaluación de la localización del dolor, calidad, intensidad, comportamiento en el tiempo, impacto en el estado de ánimo, sueño y otras actividades diarias, respuesta a tratamientos previos y consumo de alcohol u otras sustancias [312, 313].

4.3. Estrategias actuales de tratamiento

Estrategias farmacológicas

El tratamiento del dolor neuropático ó por procesos inflamatorios es complejo, y tan sólo alrededor del 50% de los pacientes afectados responden, eventualmente con alivio parcial [314]. Agravando la situación, la mayoría de los analgésicos

utilizados actualmente causan algún tipo de efecto adverso, lo que condiciona su uso en altas dosis o por tiempo prolongado [315].

Buscando hacer un aporte útil en esta situación grave, el *Grupo de Interés Especial en Dolor Neuropático (NeuPSIG según sus siglas en inglés)* de la IASP desarrolló guías basadas en la evidencia clínica para el manejo farmacológico del dolor neuropático considerando la eficacia, efectos adversos, impacto en la calidad de vida, conveniencia y costos. Así, basándose en ensayos clínicos randomizados, los medicamentos que se recomiendan como primera línea de tratamiento incluyen a ciertos **antidepresivos** (ej: antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina), los **ligandos de los canales de calcio $\alpha 2-\delta$** (ej: gabapentina y pregabalina) y la **lidocaína tópica**. Como tratamiento de segunda línea se recomiendan los analgésicos **opiáceos** y el **tramadol** aunque podrían ser utilizados como fármacos de primera línea en determinadas circunstancias clínicas. Otros fármacos que generalmente podrían ser utilizados como tratamiento de tercera línea incluyen otros **antidepresivos** y **antiepilépticos**, la **capsaicina tópica**, la **mexiletina** y los **antagonistas de los receptores del N-metil-Daspartato** [316].

Estrategias intervencionistas

Existen condiciones en las que el dolor se torna refractario y no responde a los tratamientos por tales vías. Para estos pacientes se utilizan otro tipo de terapias como por ejemplo el bloqueo epidural con anestésicos locales y esteroides para el herpes zoster o las radiculopatías espinales; el bloqueo del simpático y los tratamientos con radiofrecuencia [36, 317].

La administración de drogas intratecales también puede ser útil para el manejo del dolor refractario, optimizando la funcionalidad del paciente y minimizando el uso de fármacos sistémicos [318]. Actualmente, las dos drogas más utilizadas para la administración prolongada por vía intratecal y aprobadas por la *Food and Drug Administration (FDA)* son la morfina y el ziconotide.

Estrategias con terapia celular

En tiempos recientes ha tomado impulso el concepto de terapia celular, no sólo para mejorar la entrega de moléculas analgésicas en los sitios correctos, sino también como posible estrategia de corrección definitiva de la patología subyacente al dolor [319]. En este sentido, el trasplante de células madre es un nuevo abordaje para la reparación de un sistema nervioso dañado que genera dolor en el paciente. Las células madre: 1) son una fuentes celular totipotencial para el reemplazo de neuronas dañadas o muertas, y 2) representan una fuentes de liberación de factores tróficos para nervios y neuronas lesionadas [320].

Actualmente se explora el uso de tres tipos de células madre para el tratamiento experimental del dolor neuropático: *células madre neurales (CMN)*, *células madre mesenquimales (CMM)* y *células mononucleares de la médula ósea (CMMO)* [321]. Las CMM son un subconjunto heterogéneo de células madres estromales que pueden ser aisladas de lugares diferentes: médula ósea [322], cordón umbilical [323], placenta [324], tejido adiposo [325], pulpa dental [326], e inclusive hígado fetal [327], y pulmones [328].

Estrategias basadas en la nanotecnología

El manejo del dolor neuropático refractario continúa siendo un desafío, y se ha determinado que el objetivo para las futuras terapias deberá ser la generación de nuevas estrategias de intervención y la optimización de los fármacos actualmente disponibles y de sus vías de administración [329]. Algunos de los problemas más comunes de cualquier droga medicinal tienen que ver con su degradación, una vez que son inyectadas en el cuerpo, su dosis y liberación, y la duración de acción. Recientemente, el uso de micro- y nanopartículas se perfila como una metodología atrayente para el diseño de drogas analgésicas. De hecho, ya se han producido las primeras incursiones en el tema, con el uso de micro- y nanopartículas cargadas con ibuprofeno [330], el neuropéptido opioide morfina y sus derivados [331, 332], y plásmidos de *ácido desoxirribonucleico (ADN)* de la interleukina 10 [333]. En todos los casos, los resultados son muy prometedores, demostrándose eficacia analgésica. Esta evidencia impulsa la exploración, además de nuevos blancos farmacológicos como los receptores peptidérgicos, la de nuevos métodos de administración basados en el uso de nanopartículas.

Liposomas Multivesiculares (LMVs)

Los liposomas son estructuras lipídicas esféricas conformada por al menos una bicapa lipídica, compuesta comunmente por fosfolípidos que encapsulan un volumen acuoso. Estas estructuras se obtienen íntegramente a través de métodos de laboratorio. Los fosfolípidos utilizados para su síntesis son moléculas anfifílicas es decir contienen una parte de la molécula (la cabeza polar) soluble en agua, mientras otra parte (la cola hidrofóbica) que es insoluble en dicho solvente. Debido

a esta estructura, cuando estas moléculas se disuelven en agua, las partes hidrofóbicas tienden a asociarse para evitar el contacto con el solvente generando una estructura de bicapas [334].

Desde el punto de vista morfológico, los liposomas pueden dividirse según el número de capas que lo conforman o según su tamaño. Según el número de capas se clasifican en multilamelares o unilamelares [335](Figura I.4). Los multilamelares se caracterizan por poseer múltiples capas concéntricas que definen compartimientos acuosos concéntricos con un rango de tamaño de 0,2-10 μm (Figura I.4). Los unilamelares están formados por una única bicapa lipídica que definen un único compartimiento acuoso y en función de su tamaño que se pueden dividir en pequeño (0,02-0,200 μm), grandes (0,2 a 1 μm) o gigantes (>1 μm) (Figura I.4). Los LMVs constituyen otra familia de liposomas que se diferencian de los multi- o unilamelares por su estructura y función. En los LMVs las capas no son concéntricas, sino que se conforman en múltiples cavidades con un tamaño y estabilidad muy superior a estos últimos [335]. El rango de tamaño varía de 1 μm hasta 100 μm aproximadamente, y en sus cavidades pueden albergar gran cantidad de sustancias de distinta naturaleza, como proteínas, fármacos, por lo que muestran una enorme versatilidad de uso (Figura I.4). A su vez el tamaño de las cavidades internas puede modificarse a través de la modulación de distintos parámetros durante su preparación y son utilizados por su capacidad para liberar fármacos de una manera sostenida en el tiempo [336].

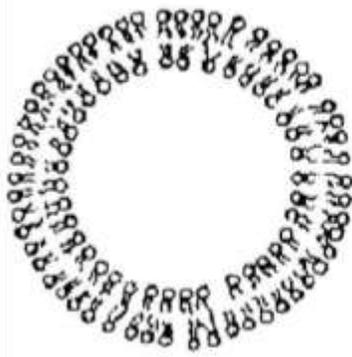
Dada las características mencionadas de los LMVs, estos sistemas son adecuados para la administración sostenida de drogas en el tratamiento del dolor agudo y crónico. Por ejemplo, EXPAREL® es el nombre comercial de la bupivacaína

encapsulada en LMVs aprobada por la FDA y comercializada por Pacira Pharmaceuticals (San Diego, CA, USA). Esta formulación está indicada para el tratamiento post-quirúrgico, ya que posee un efecto analgésico local más prolongado que la bupivacaina HCl [337]. Otro ejemplo utilizado es el DepoDur®, que es la formulación inyectable de morfina que utiliza la tecnología de LMVs. La vida media del DepoDur® (Pacira Pharmaceuticals; San Diego, CA, USA) es 444 veces mayor que la vida media de esta droga sin encapsular (0,45hs a 199hs). Otra gran ventaja reside en los picos máximos de droga que se alcanzan mediante la liberación sostenida, menores a los logrados mediante aplicaciones de la droga libre, dificultando así las sobredosificaciones. DepoDur® está indicado por vía epidural para el tratamiento de dolor después de una cirugía mayor, proporcionando un alivio efectivo durante un máximo de 48 horas después de una inyección epidural, mejorando la movilidad de los pacientes sin requerir catéteres permanentes. DepoDur® fue aprobado por la FDA en 2004 y actualmente lo comercializa la empresa ERK Therapeutics INC [338].

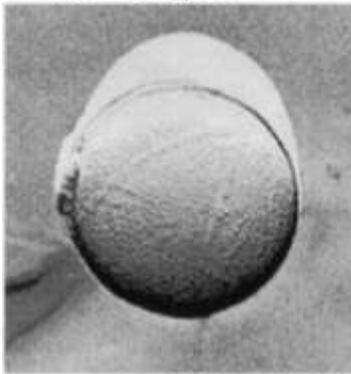
Figura I.4. Esquema e imagen de microscopia electrónica de un liposoma. A: unilamelar, **B:** multilamelar y **C:** multivesicular. Figura adaptada de [335].

Figure I.4. Electronic microscope image and diagram of a liposome. A: unilamellar, **B:** multilamellar and **C:** multivesicular liposome. Figure adapted from [335].

A



0.1 - 0.5 μm



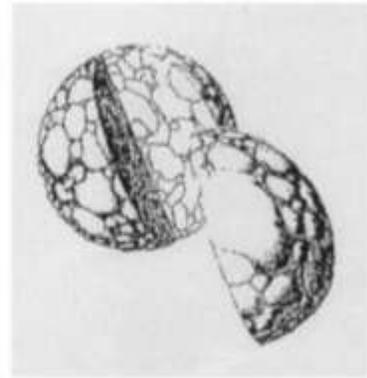
B



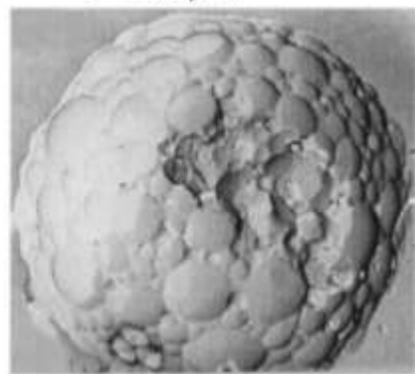
0.2 - 5 μm



C



1 - 100 μm



5. Modelos animales para el estudio del dolor

El estudio del dolor neuropático en humanos es complejo. Por un lado, aún en condiciones altamente controladas, la evaluación del dolor en humanos mediante métodos físicos, cuantificables y objetivos se dificulta por los altos costos involucrados (equipamiento, personal calificado, estructura institucional). Además, los estímulos requeridos para inducir dolor neuropático producen daños irreversibles y es complejo inducir lesiones controladas de nervios o estructuras, para el estudio pormenorizado de mecanismos celulares y moleculares. Es por eso que este tipo de investigación, si bien es altamente necesario dada la prevalencia y dificultoso manejo terapéutico del dolor, resulta difícil a la hora del reclutamiento de suficientes y adecuados casos experimentales. De allí que a lo largo de los años fueran desarrollándose diferentes modelos reproducibles en animales de dolor neuropático reproducibles, para ampliar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos involucrados y para evaluar el potencial analgésico de nuevas terapias farmacológicas.

Los modelos ideales de dolor buscan reproducir alteraciones sensitivas como la alodinia, la hiperalgesia y el dolor espontáneo durante un tiempo controlado. Si bien con algunas limitaciones, ha sido posible establecer a lo largo de los años un número de modelos animales para la replicación del dolor motivado por diferentes etiologías y consecuentemente con diversas manifestaciones de ese dolor. Actualmente, se cuenta con modelos animales de dolor por lesión mecánica, metabólica, infecciosa química e iatrogénica (ver tabla I.3). En el capítulo Materiales y Métodos, se describen en detalle los modelos de lesión utilizados en esta tesis.

Tabla I.3. Tabla donde se presentan los principales modelos animales de dolor por lesión mecánica, metabólica, infecciosa o química.

Table I.3. Table that presents the main animal models of neuropathic pain caused by mechanical, metabolic, infectious or chemical injuries.

Nombre del modelo	Mecanismo de la injuria	Especie	Referencia
Dolor neuropático			
Nervio ciático			
Axotomía	Sección completa del nervio ciático	Rata	Wall P.D 1979; Muthuraman A 2008; Wall P.D., Scadding J.W 1979; Zeltser R. 2000
Lesión por compresión crónica	Cuatro ligaduras suaves alrededor del nervio ciático	Rata, ratón	Bennett G.J 1988; Muthuraman A 2008; Martucci C 2008; Sacerdote P 2008
Ligadura parcial del nervio ciático	Ligadura fuerte de un tercio o medio nervio ciático	Rata, ratón	Seltzer 1990; Decosterd I.,2000; Bourquin A.F 2006; Shields S.D. 2003
Ligadura de un nervio espinal	i. Ligadura fuerte de los nervios L5, L6 ii. Ligadura fuerte del nervio L7	Rata	i. Kim S.H 1992; Komori N 2007 ii. Carlton S.M 1994
Médula espinal			
Lesión por peso o contusión de la médula espinal	Dejar caer un peso sobre la médula espinal expuesta	Rata, ratón	Siddall P.J 1995; Drew G.M 2001; Genovese T 2008
Hemisección medular	Laminectomía de los segmentos T11 – T12	Rata	Christensen M.D 1996; Kim J 2003
Irradiación medular con láser	Irradiación medular con láser para producir injuria por isquemia	Rata	Hao JX 1991
Tálamo y encéfalo			
Dolor talámico	Microinyección de agentes excitotóxicos como la picrotoxina o cainato en núcleos del tálamo	Rata	Oliveras JL 1994; LaBuda CJ 2000
Dolor por accidente cerebrovascular hemorrágico	Microinyección de colagenasa tipo IV directo en el tálamo	Rata	Wasserman JK 2009
Dolor por inflamación			
Inyección de capsaicina	Inyección de capsaicina en la piel, músculos o articulaciones	Rata, ratón	Szolcsanyi, J 1985; Tominaga M 1998
Inyección de carragenina	Inyección de carragenina en la piel, músculos o articulaciones	Rata, ratón	Hargreaves K 1998; Radhakrishnan R 2003
Inyección del adyuvante completo de Freund (CFA)	Inyección del CFA en la cola, pata, músculos o articulaciones	Rata, ratón	Gauldie et al., 2004; Neugebauer et al., 2007
Dolor por cáncer			
Dolor por cáncer en los huesos fémur, tibia, calcáneo y húmero	Inoculación de células tumorales en dichos huesos	Rata, ratón	Schwei M.J. 1999; Wacnik P.W 2001; Medhurst S.J 2002; Mao-Ying Q.L 2008
Dolor neuropático oncológico	Hacer crecer un tumor cercano al nervio ciático	Ratón	Shimoyama M 2002; Hald A 2009
Dolor artrítico			
Dolor por artritis reumatoide	Inyección de anticuerpos contra el colágeno tipo II		Vincent TL 2012
Dolor por osteoartritis	Destrucción de los tejidos circundantes a una articulación	Rata, ratón	Christianson CA 2012; Vincent TL 2012
Dolor muscular			
Miositis	Inyección de un compuesto irritante en el músculo(carragenina, CFA, formalina)	Rata, gato	Ambalavanar R 2007; Chacur M 2009; Diehl B 1988; Fujii Y 2008; Han SR 2008; Radhakrishnan R 2003
Fibromialgia o dolor miofascial	Inyecciones repetidas de solución salina a un pH de 4 en el gastrocnemio	Ratón	Pratt D 2013; Sluka KA 2001; Sluka KA 2012; Sluka, KA 2003; Tillu DV 2008
Dolor post operatorio			
Incisión plantar	Incisión longitudinal de la piel, fascia o músculo de la planta de la pata posterior	Rata	Brennan TJ 1996; Pogatzki EM 2002
Dolor visceral			
Distensión abdominal	Se infla un globo dentro del colon y se registra la actividad electromiográfica de los músculos abdominales	Rata	Ness TJ 1987; Ness TJ 1987b; Ness TJ 1988
Injuria a la vejiga	Inyección de agentes nocivos para la vejiga (VEGF, ciclofosfamida, infección bacteriana)		Bjorling DE 2008; Malykhina AP 2013; Stemler KM 2013

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es el estudio de los sistemas neuronales involucrados en la transmisión del dolor, enfocándonos en las neuronas aferentes primarias y de la médula espinal, su neuroquímica y cambios frente a diferentes tipos de lesión periférica, y la posible asociación existente entre tales cambios y la conducta del dolor de los animales en estudio. Asimismo, la presente tesis busca hacer aportes útiles ante la necesidad de desarrollar nuevas y confiables estrategias terapéuticas para el tratamiento del dolor neuropático. Para ello, estudiamos el potencial de la modulación de receptores neuropeptidérgicos como el Y1R, la utilización de células mononucleares de médula ósea, y la exploración del uso de micropartículas como agentes de administración de drogas analgésicas.

Objetivos específicos e hipótesis

Objetivo 1. Analizar el patrón de expresión de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) 1-3 en neuronas aferentes primarias de los GARDs lumbar 4 y 5, y neuronas de la médula espinal en niveles torácicos, lumbares y sacros. Estudiar si se producen cambios en tales patrones luego de la axotomía unilateral del nervio ciático o la inflamación unilateral de la planta de la pata posterior del ratón. Finalmente, correlacionar nuestras observaciones con el número creciente de trabajos que asocian la función de los VGLUTs y la modulación del dolor.

Hipótesis: Se observará una variada expresión de los VGLUTs en neuronas aferentes primarias y de la médula espinal dependiente del tipo de VGLUT considerado; la lesión del nervio ciático o la inducción de inflamación plantar modificará tales patrones de expresión.

Objetivo 2. Analizar los potenciales cambios en la expresión inmunohistoquímica de un número de marcadores neuroquímicos asociados al dolor en neuronas de los GARDs y la médula espinal, luego de la axotomía de las raíces espinales L6 y S1 (tributarios del nervio pélvico y pudendo) en el ratón.

Hipótesis: La lesión de los ramos tributarios de los nervios pélvico y pudendo (nervios mixtos somáticos y viscerales) resultará en cambios profundos en la expresión de varios marcadores de neuronas aferentes primarias corrientemente asociados a los mecanismos del dolor.

Objetivo 3. Estudiar el efecto de la activación farmacológica a nivel espinal de los receptores de tipo 1 del neuropéptido tirosina (Y1R) sobre el umbral de dolor inducido por estímulo mecánico y frío en ratas con compresión unilateral crónica del nervio ciático.

Hipótesis: La administración intratecal de un agonista específico del Y1R en ratas con compresión crónica del nervio ciático resultará en una acción antialodínica dosis-dependiente.

Objetivo 4. Estudiar el efecto del tratamiento sistémico con las CMMO sobre la regeneración del nervio ciático en ratas con compresión unilateral transitoria de dicho nervio. Analizar el impacto del uso de las CMMO sobre la velocidad de conducción del nervio lesionado en vías de regeneración. Finalmente, evaluar si la inyección sistémica de CMMO afecta la aparición de dolor por estímulo mecánico y térmico en las ratas con compresión transitoria del nervio ciático (parte de este objetivo cuenta con datos previamente reportados en la tesis de la Dra. Vanina

Usach y mostrados como referencia, además de información original desarrollada en el contexto de la presente tesis doctoral).

Hipótesis: La administración sistémica de las CMMO promoverá una acción antialodínica y regenerativa en ratas con compresión transitoria del nervio ciático.

Objetivo 5. Sintetizar LMVs para la encapsulación de morfina y clonidina para luego ser administradas por vía intratecal, y permitir optimizar y extender los efectos analgésicos terapéuticos.

Hipótesis: Será posible incorporar fármacos analgésicos clásicos como la morfina, y coadyuvantes como la clonidina, en LMVs para su posterior administración intratecal.

Main objective

The main objective of this thesis is the study of the neuronal systems involved in the transmission of pain, focusing on primary afferent neurons and the spinal cord, their neurochemistry and changes after different types of nerve injuries, and the possible association between these changes and the painful behavior in the animals we studied. Likewise, the present thesis aims to provide useful information necessary to develop new and reliable therapeutic strategies for the treatment of neuropathic pain. For this purpose, we studied the potential of the modulation of the neuropeptidergic receptors such as Y1R, the utilization of bone marrow mononuclear cells and the use of nanoparticles as delivery agents of analgesic drugs.

Specific objectives and hypothesis

Objective 1. To analyze the expression pattern of the vesicular glutamate transporters (VGLUTs) 1–3 on L4 – 5 DRGs primary afferent neurons and neurons of the thoracic, lumbar and sacral spinal cord. To determine if these patterns change after a unilateral sciatic nerve axotomy or the unilateral inflammation of the mice hindpaw. Finally, to correlate our observations with the increasing number of studies that associate the VGLUTs function and the modulation of pain.

Hypothesis. A varied, VGLUT-type-dependent expression of VGLUTs in the primary afferent and spinal cord neurons will be observed; sciatic nerve injury or the inflammation of the hindpaw will result in changes in expression of VGLUTs.

Objective 2. To analyze the potential changes in the immunohistochemical expression of various neurochemical markers associated with pain in DRG neurons

and the spinal cord, after an axotomy of the L6 and S1 spinal nerves (tributaries of the pelvic and pudendal nerve) of mouse.

Hypothesis. The injury of the tributaries of the pelvic and pudendal nerves (somatic and visceral nerves) will result in deep changes of the expression of multiple markers of primary afferent neurons currently associated with pain mechanisms.

Objective 3. To study the effect of the pharmacological activation of neuropeptide tyrosine type 1 receptor (Y1R) in the spinal cord on the pain threshold induced by mechanical or cold stimuli in rats with chronic constriction nerve injury.

Hypothesis. The intrathecal administration of a specific Y1R agonist will result in a dose-dependent anti-allodynic effect in rats with chronic compression of the sciatic nerve.

Objective 4. To study the effect of the systemic treatment with bone marrow mononuclear cells on the regeneration of the sciatic nerve in rats with a crush injury of such nerve. To analyze the impact of the administration of these cells on the velocity of conduction of the regenerating injured nerve. Finally, to evaluate if the administration of these cells affects the appearance of mechanical or thermal induced pain in rats with crush injury (relevant data previously reported in the thesis of Dr. Vanina Usach is included in this objective and provided as reference, to which new original data developed in the context of the present doctoral thesis is added).

Hypothesis. The systemic administration of the bone marrow mononuclear cells will promote an anti-allodynic and regenerative effect in rats with sciatic nerve crushing.

Objective 5. To produce multivesicular liposomes to encapsulate morphine and clonidine, for subsequent intrathecal administration and the optimization and extension of duration of therapeutic analgesic effects.

Hypothesis. It will be possible to encapsulate classic analgesic drugs like morphine and a co-adjuvant, like clonidine, in the multivesicular liposomes for their posterior intrathecal administration.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Consideraciones éticas

Nuestro objetivo último es comprender mejor un problema biomédico de difícil solución, y eventualmente, lograr respuestas que sirvan de punto de partida para el mejoramiento de la vida de miles de personas en el Mundo. Desafortunadamente, para alcanzar este objetivo debemos recurrir a experimentación animal, ya que procedimientos similares no serían éticamente aceptables en humanos.

El tipo de investigación propuesto en esta tesis incluye el análisis inmunohistoquímico, farmacológico y conductual, en el último caso realizado en animales conscientes. Sin embargo, y para minimizar el sufrimiento de los animales experimentales, todos los protocolos de investigación propuestos se adhieren a las normas bioéticas Nacionales – Disposición ANMAT 5330/97 – e Internacionales – Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones, Society for Neuroscience (SFN) e International Association for the Study of Pain (IASP) para el cuidado y uso de animales en investigación, y fueron realizados de acuerdo a las regulaciones impartidas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de las Universidades Austral (Buenos Aires) y Pittsburgh (Estados Unidos).

En todo momento, se ha tenido el máximo cuidado al momento de recibir, mantener y sacrificar a los animales, asegurando las condiciones de temperatura, ciclos de luz/oscuridad, alimentación e hidratación y las actividades recreacionales. Más aún, si por razón del tratamiento recibido, cualquier animal perdiera más del 10% de su peso corporal, o manifestara alteraciones en la conducta que indicaran estrés excesivo por más de 2-3 días, se procedió a su separación y sacrificio por

medio de la inyección de hidrato de cloral y posterior dislocación cervical. Cabe aclarar que estos casos fueron infrecuentes.

Los tests de conducta del animal fueron desarrollados de acuerdo a los estándares y métodos establecidos (publicaciones, recomendaciones societarias, regulaciones locales), evitando el sufrimiento innecesario del animal. Y, finalmente, se buscó limitar la cantidad de animales utilizados para la obtención de datos confiables (alrededor de 6 animales por grupo cuando se trató de experimentos con cuantificación neuronal; 8-12 animales por grupo cuando se trató de ensayos de conducta o electrofisiología).

Todos los animales fueron mantenidos en un bioterio con ciclo día/noche de 12 horas, con acceso *ad libitum* a agua y comida. Previo a cualquier intervención quirúrgica, los animales fueron anestesiados utilizando anestésicos inhalatorios (Isoflurano, 5% para inducción, 2.5% para mantenimiento, 1L/min O₂; Piramidal Healthcare, London, UK) o inyectables (mezcla de ketamina (75 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg); Laboratorio Richmond, Buenos Aires, Argentina). Con el motivo de brindar analgesia postquirúrgica, los animales recibieron una dosis subcutánea de dexketoprofeno trometamol (5mg/kg; Lab Argentinia, Bs. As., Argentina) y una aplicación tópica de lidocaína en gel al 2% (AstraZeneca, Buenos Aires, Argentina) en las incisiones quirúrgicas. En el caso de la perfusión transcardíaca, los animales recibieron una dosis terminal de hidrato de cloral por la vía intraperitoneal (300 mg/kg; Biopack, Buenos Aires, Argentina). Y, en el caso de animales destinados a experimentos de hibridización *in situ*, los mismos fueron primero expuestos a dióxido de carbono en una cámara cerrada (secuestro de oxígeno) hasta la

desaparición de movimientos respiratorios, seguido de rápida decapitación y recolección de tejidos.

2. Animales

Se utilizaron los siguientes roedores:

- Ratones BALB/c macho (Proyecto I, n=51; Proyecto II, n=24), entre 6 y 8 semanas de edad (25-30 gramos de peso).
- Ratas Sprague–Dawley macho (n= 86), entre 7 y 8 semanas de edad (200-300 gramos de peso) (Proyecto III).
- Ratas Wistar de ambos sexos (n=112), entre 6 y 8 semanas de edad (250-350 gramos de peso) (Proyecto IV).

3. Modelos de lesión de nervios periféricos

En la presente tesis, fueron utilizados distintos modelos de lesión para el estudio del dolor en animales (Figura M.M.1 y 2).

3.1 Lesión mecánica

Axotomía del nervio ciático [339] (Proyecto I)

En ratones bajo anestesia inhalatoria, el nervio ciático derecho fue expuesto a la altura media del muslo y un segmento entre 5-8 mm de largo fue disecado del tejido circundante. Luego el nervio fue fuertemente ligado y seccionado distal a la ligadura. En todos los casos, se resecó un segmento de 5 mm de largo distal a la sección para evitar cualquier posibilidad de re-unión entre los dos extremos del nervio. En los animales control se expuso y disecó cuidadosamente el nervio ciático

del tejido circundante, pero no fue seccionado. A continuación, músculos y piel fueron suturados en capas y los ratones se mantuvieron sobre una superficie atemperada hasta su recuperación de la anestesia. Los animales así operados fueron mantenidos en el bioterio por 7 días (Figura M.M.1).

Axotomía de las ramas que contribuyen al nervio pélvico [340]

(Proyecto II)

En ratones bajo anestesia inhalatoria, las ramas ventrales de los nervios espinales lumbar 6 y sacro 1 izquierdos, ambos tributarios de los nervios pudendo y pélvico en el ratón, fueron expuestas, mediante laparotomía aséptica y posterior disección. Una vez expuestas, ambas ramas fueron fuertemente ligadas y axotomizadas, distal a las ligaduras. En los animales control se expusieron las mismas ramas de los nervios espinales, pero no fueron seccionadas. A continuación, músculos y piel de la región abdominal fueron suturados en capas y los ratones se mantuvieron sobre una superficie atemperada hasta su recuperación de la anestesia. Los animales así operados fueron mantenidos en el bioterio por 12 días (Figura M.M.2A).

Lesión por compresión crónica (LCC), Modelo de Bennett, [341]

(Proyecto III)

En ratas bajo anestesia inhalatoria, el nervio ciático derecho fue expuesto a la altura de la mitad del fémur y cuidadosamente disecado del tejido circundante utilizando instrumentos de microcirugía. Luego, el nervio fue ligado suavemente con 4 hilos de sutura de seda 5.0 (hasta observar la interrupción del flujo sanguíneo del

vasa nervorum comprimido junto al nervio). En los animales control se expuso y disecó cuidadosamente el nervio ciático del tejido circundante, pero no fue ligado. A continuación, músculos y piel fueron suturados en capas y las ratas fueron mantenidas sobre una superficie atemperada hasta su recuperación de la anestesia. Seguidamente, las ratas así operadas fueron mantenidas en el bioterio por un total de 16 días (Figura M.M.1B).

Compresión transitoria (crush) [342] (Proyecto IV)

En ratas bajo anestesia inyectable, el nervio ciático derecho fue expuesto a la altura media del muslo y un segmento entre 8-10 mm de largo fue disecado del tejido circundante. Luego, el nervio fue sometido a compresión de 8 segundos con la máxima intensidad posible utilizando una pinza de relojero Dumont N°5. En los animales control se expuso y disecó cuidadosamente el nervio ciático del tejido circundante, pero no fue comprimido. A continuación, músculos y piel fueron suturados en capas y las ratas se mantuvieron sobre una superficie atemperada hasta su recuperación de la anestesia. Los animales así operados fueron mantenidos en el bioterio por 49 días (Figura M.M.1C).

3.2 Lesión inflamatoria (Proyecto I)

Adyuvante completo de Freund [342]

En ratones bajo anestesia inhalatoria, se inyectaron 20µl de una solución 1:1 de CFA (Sigma, St. Louis, MO, USA) en el espacio intradérmico de la superficie plantar de la pata posterior izquierda del animal (ratón) utilizando una jeringa de 1ml y una aguja 27G. Los animales control recibieron una inyección de 20µl de

solución salina. Los animales así intervenidos se recuperaron en un ambiente cálido y luego fueron mantenidos en el bioterio para cumplir los tiempos de sobrevivencia previamente definidos (1 y 3 días) (Figura M.M.1D).

Figura M.M.1. Esquemas y fotografías que muestran cuatro modelos diferentes de dolor crónico. **A:** En el modelo de axotomía del nervio ciático, el nervio es ligado (no se muestra en la figura) y luego axotomizado distalmente. **B;** El modelo de lesión por compresión crónica consiste en colocar cuatro ligaduras suaves en el nervio ciático. **C:** En el modelo de compresión transitoria, se expone el nervio ciático y luego es comprimido durante 8 segundos. **D:** En el modelo de lesión de inflamatoria crónica, el animal es inyectado con CFA en el espacio intradérmico de la superficie plantar de la pata posterior (Figura adaptada de [343, 344]).

Figure M.M.1. Schematic drawings and photographs showing four different chronic pain models. **A:** In the sciatic nerve axotomy, the nerve is ligated (not shown) and then distally axotomized. **B:** The chronic constriction injury (CCI) model involves placement of four loose ligatures on the sciatic nerve. **C:** In the crush nerve model, the sciatic nerve is exposed and then crushed for 8 seconds. **D:** In the chronic inflammatory model, the animal is injected with CFA in the intradermic space of the hindpaw (Figure adapted from [343, 344]).

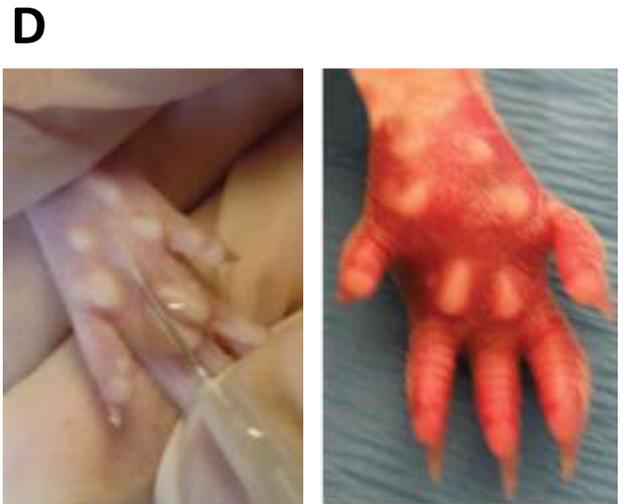
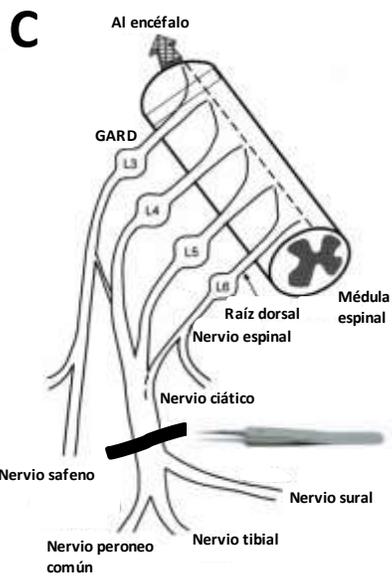
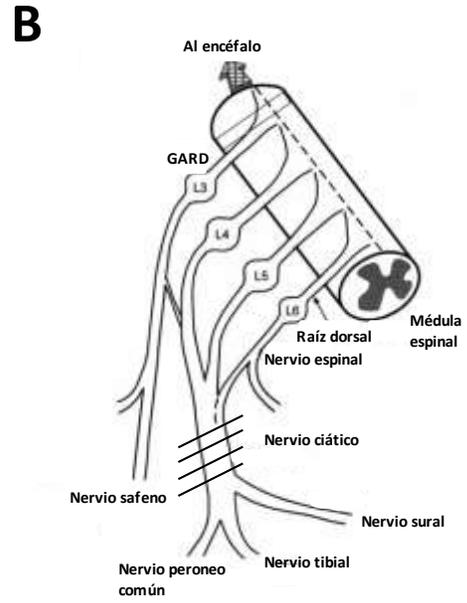
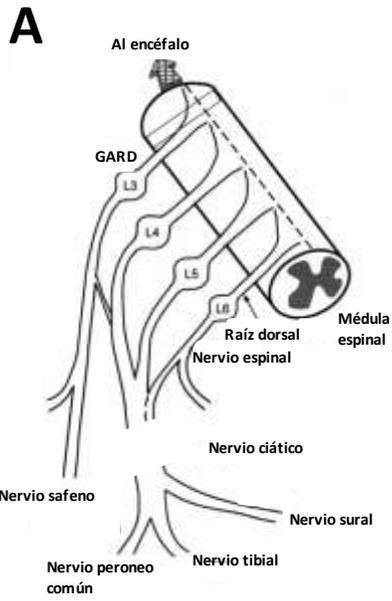
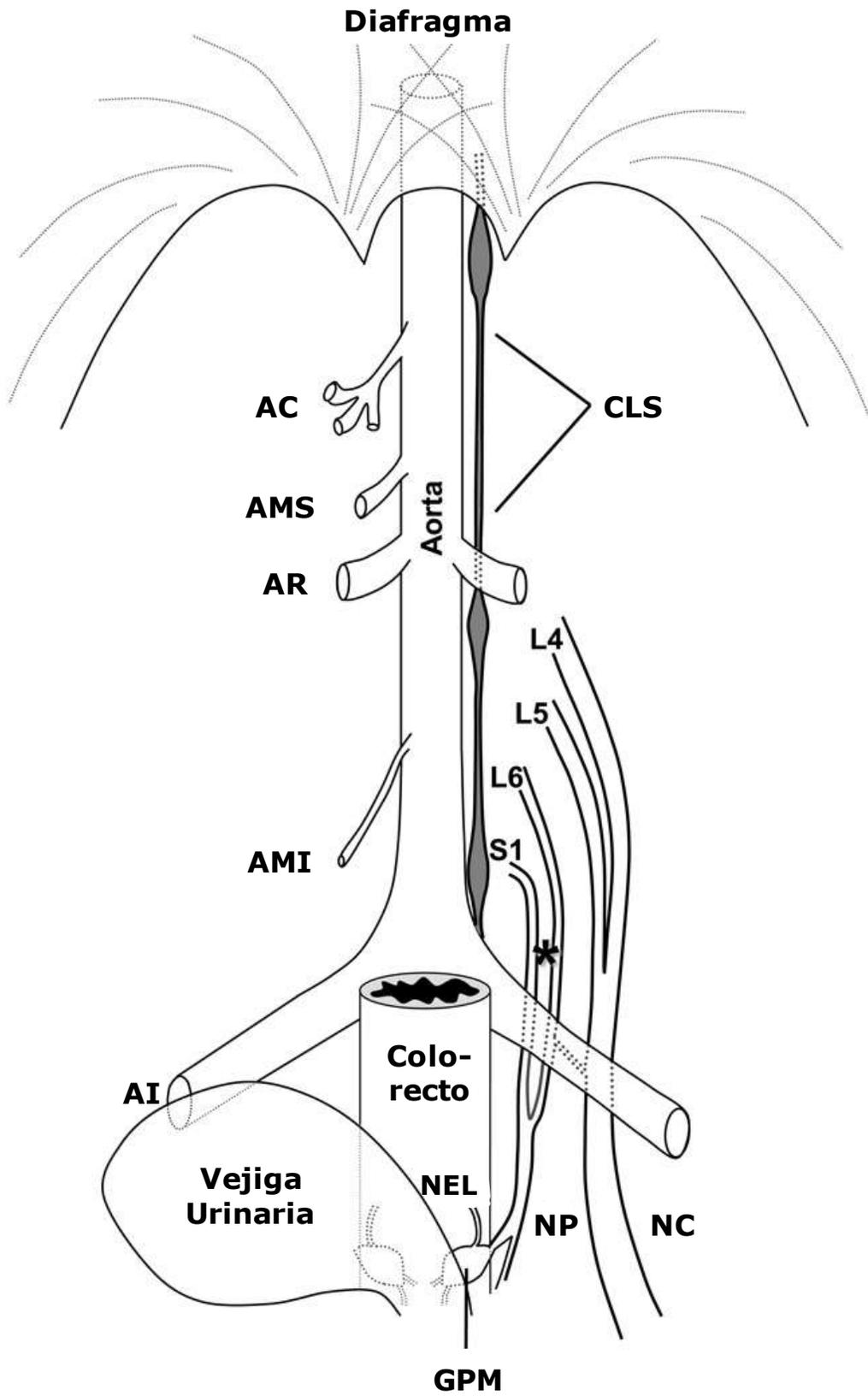


Figura M.M2. Representación esquemática de algunas de las estructuras abdominales vasculares y nerviosas, además del diafragma, la vejiga y el colorrecto, en el ratón. Con un asterisco, se marca el sitio de axotomía de los nervios espinales L6 y S1 (ramas tributarias del nervio pélvico y pudendo) en el modelo de lesión neuropática visceral utilizado en esta tesis (Proyecto 2). AC: Arteria celíaca; AI: Arteria ilíaca; AMI: Arteria mesentérica inferior; AMS: Arteria mesentérica superior; AR: Arteria renal; CLS: Cadena lumbar simpática; GPM: Ganglio pélvico mayor; NC: Nervio ciático; NEL: Nervio esplácnico lumbar; NP: Nervio pélvico. Tomado de [340].

Figure M.M2. Schematic representation of some of the vascular and nervous abdominal structures, other than the diaphragm, urinary bladder and colorrectum in the mouse. An asterisk indicates the localization of the axotomy of the L6 and S1 spinal nerves (tributary branches of the pelvic and pudendal nerves) in the visceral neuropathic model used in this thesis (proyect 2). AC: celiac artery; AI: iliac artery; AMI: inferior mesenteric artery; AMS: superior mesenteric artery; AR: renal artery; CLS: sympathetic lumbar chain; GPM: major pelvic ganglion; NC: sciatic nerve; NEL: splacnic lumbar nerve; NP: pelvic nerve. Taken from [340].



4. Procedimientos farmacológicos / Terapia celular (Proyectos III y IV)

4.1 Procedimientos farmacológicos (Proyecto III)

Cateterización intratecal

Tanto en ratas con LCC de siete días de evolución, como en ratas control, se insertó una aguja 20G entre las vértebras lumbares L5 y L6, facilitando el pasaje de un catéter intratecal de 20 cm de longitud (PE 10). Una vez en el espacio intratecal (evidenciado por la emergencia de una cantidad mínima de líquido cefalorraquídeo y/o el movimiento reflejo de la cola de la rata), el extremo espinal del catéter fue cuidadosamente empujado hasta alcanzar la altura del ensanchamiento lumbar de la médula espinal. Una vez logrado esto, se retiró la aguja, y luego de fijar el segmento inicial del catéter en la zona de emergencia, el extremo externo del catéter fue exteriorizado a la altura de la nuca, luego de ser tunelizado bajo la piel del dorso de la rata. Este extremo se utilizó posteriormente para la inyección de las drogas de aplicación intratecal a testear. La localización adecuada del catéter se evaluó 24 h antes de la conducta farmacológica, por medio del testeo de la respuesta motora a la administración intratecal de 10 μ l de lidocaína (50 mg/ml). Las drogas a estudiar fueron testeadas a los 14 días de inducida la LCC, sobreviviendo a la cual se observan claras conductas de dolor neuropático en el animal lesionado (Figura M.M3).

Figura M.M3. Línea de tiempo que indica los procedimientos quirúrgicos realizados y la estrategia de administración usada en el Proyecto III.

Figure M.M3. Timeline that represents the surgical procedures and the pharmacological strategy used in Project III.

Día 1



Compresión crónica del nervio ciático

Día 7

Ingreso de la cánula **Exteriorización de la cánula**



Colocación de cánula intratecal

Día 13

Inyección de lidocaína al 2%



Día 14

Administración farmacológica / Pruebas de conducta

Agonista farmacológico y estrategia de administración

El agonista Leu³¹,Pro³⁴-Neuropéptido Y (agonista del Y1R; Tocris Bioscience, Bristol, UK) fue inyectado en un volumen de 10 µl, y a concentraciones de 2,5, 5, 7, 10 y 20 µg/10µl. El efecto del agonista fue puesto en evidencia mediante pruebas de respuestas conductuales de dolor. En este sentido, se evaluó la sensibilidad al estímulo mecánico y térmico en un período de 90 y 108 minutos, respectivamente, luego de la inyección de la droga en estudio. La puesta a prueba de las diferentes concentraciones (dosis) permitió obtener la curva dosis-respuesta de la droga experimental.

Para estos experimentos, fueron empleados dos tipos de control: 1) Ratas sometidas a la exposición del nervio ciático, pero sin lesión del mismo (ratas sham), con subsiguiente cateterización (día 7) y aplicación de 10 ug de Leu³¹,Pro³⁴ (día 14); 2) Ratas sometidas a LCC del nervio ciático con subsiguiente cateterización (día 7) y aplicación de ácido acético al 0.25% (vehículo utilizado para administración de Leu³¹,Pro³⁴ (día 14)).

4.2 Aislación, caracterización y uso de las CMMO en terapia celular experimental (*Proyecto IV*)

Técnicas de aislamiento de CMMO

Se disecaron los fémures y tibias de ratas Wistar adultas de ambos sexos (300–400 g). Seguidamente, los extremos de estos huesos fueron cortados y se extrajo la médula ósea mediante un lavado con α -MEM/10% FCS (*suero de ternero fetal, según sus siglas en inglés*; Natocor, Argentina) y subsiguiente aspiración utilizando una aguja 21G y una jeringa de 10 ml. Los aspirados se centrifugaron

durante 30 min a 1000 x g en un gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus; 1.077 g/ml). Se combinó el sobrenadante con la interfase y se centrifugaron durante 10 min a 1000 x g. Así, se obtuvo una fracción celular mononuclear conteniendo *células estromales de médula ósea (CEMO)*, *células madre hematopoyéticas (CMH)*, células madre no-hematopoyéticas, células precursoras no hematopoyéticas y células precursoras endoteliales [345, 346]. Se obtuvieron entre 15–20 millones de células de cada animal [347].

Caracterización de las CMMO

Citometría de flujo

Las CMMO recién aisladas fueron lavadas en *buffer fosfato salino (PBS según sus siglas en inglés)* suplementado con un 1% de FCS y posteriormente incubadas con anti-CD34, un marcador de células progenitoras (1/25, IgG policlonal de cabra, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), anti-CD90, un marcador de células multipotentes y fibroblastos (1/25, IgG monoclonal de ratón, clon OX-7, Chemicon Int., Darmstadt, Alemania), anti-CD45, un marcador panhematopoyético (1/200, IgG monoclonal de ratón, clon MRC OX-1, Chemicon Int.), anti-CD11b, un marcador mielomonocítico (1/200, IgG monoclonal de ratón, clon OX-42, Chemicon Int.), FITC anti-CD3, un marcador de linfocitos T (IgG monoclonal de ratón, clon G4.18, BD), anti-CD105, un marcador de células estromales mesenquimales (1/25, IgG policlonal de conejo, Bioss), la *proteína mielínica básica (MBP, según sus siglas en inglés)* anti-rata (donado generosamente por el Dr. Campagnoni, UCLA, Unidad de Investigación en Neurociencias, Departamento de Psiquiatría y Ciencias del Comportamiento, LA, EE.UU.; 1/25, IgG policlonal de

conejo, Abcam) y anti-S100 β , un marcador de CS (1/25, IgG policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por una hora a *temperatura ambiente* (TA). Para marcación del linaje de macrófagos CD68 (1/50, IgG monoclonal de ratón, clon ED1, Serotec., Oxford, UK), y previo a la incubación con el anticuerpo, se fijaron las células en paraformaldehído al 0,01% por 10 minutos y luego se permeabilizaron con PBD-Tween20 al 0,5% por 15 minutos (Tabla M.M1). Luego de varios lavados, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 o Cy2 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) (Tabla M.M1) por una hora a TA en un ambiente oscuro. Las células fueron lavadas nuevamente y analizadas con un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Se utilizó como control a las CMMO autofluorescentes y al acople no específico del anticuerpo secundario.

Preparación del ARN y RT-PCR

El ARN total se extrajo de las CMMO utilizando el Mini Kit RNeasy, siguiendo las instrucciones del productor. Los cebadores utilizados se describen en la tabla M.M2.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

El ARN de interés fue incubado con cebador oligo-dT durante 5 min a 70°C. La *transcripción reversa* (TR) se llevó a cabo durante una hora a 42°C en la siguiente mezcla: 1 x buffer, 5 mM de DTT, 10 mM de dNTPs y 200 unidades de la transcriptasa reversa M-MLV. El producto de la reacción se guardó a -20°C. La amplificación de la PCR se realizó en la siguiente mezcla: 1 x de buffer de PCR, 1,25

unidades de la ADN Taq polimerasa, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs y 200 ng/μl de cebadores específicos. La mezcla se preparó antes de agregar el *ADN complementario (ADNc)*. Las secuencias de los cebadores para los diferentes marcadores se describen en la tabla M.M2. Luego de la amplificación, los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%, excepto por P0 (1,8%) y se visualizó con Sybr Safe. Las reacciones sin el templado del ADNc se corrieron como controles negativos.

Tabla M.M1. Lista y características de los anticuerpos utilizados en esta tesis.

Table M.M1. List and characteristics of the antibodies used in the present thesis.

Inmunomarcador	Especie de origen	Dilución	Referencia
Anticuerpos primarios			
Factor de transcripción dependiente de AMPc 3 (ATF3)	Conejo	1:4000	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP)	Conejo	1: 12000	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1)	Conejo	1:4000	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Tirosina hidroxilasa (TH)	Conejo	1:4000	Millipore, Temecula, CA, USA
Transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1)	Conejo	1:4000	Frontier Science, Hokkaido, Japón
Transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2)	Conejillo de india	1:4000	Frontier Science, Hokkaido, Japón
Anti-CD34	Cabra	1:25	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Anti-CD90	Ratón	1:25	Millipore, Temecula, CA, USA
Anti-CD45	Ratón	1:200	Millipore, Temecula, CA, USA
Anti-CD11b	Ratón	1:200	Millipore, Temecula, CA, USA
Anti-CD3	Ratón	1:25	BD Biosciences, San José, CA, USA
Anti-CD105	Conejo	1:25	Bioss, Woburn, MA, USA
Anti-S100β	Conejo	1:25	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Anti-CD68	Ratón	1:50	Bio-Rad, Kidlington, UK
Proteína básica mielínica	Conejo	1:400	Donado por el Dr. Campagnoni, UCLA, LA, USA
Neurofilamento 200 (NF-200)	Ratón	1:10	Donado por el Dr. Monje, Miami, FL, USA
Anticuerpos secundarios			
Anti-conejo	Burro	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
(conjugado con Cy2 o Cy3)	Cabra	1:200 1:1000	Sigma, Saint Louis, MO, USA Jackson Immuno Research
Anti-conejillo de india	Burro	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Anti-ratón	Burro	1:1000	Jackson Immuno Research
(conjugado con Cy2 o Cy3)		1:200	Sigma, Saint Louis, MO, USA

Tabla M.M2. Secuencia de cebadores. Secuencia de los cebadores utilizados en los estudios de RT-PCR descritos en dirección sentido (S) y antisentido (AS).

Table M.M2. Primer sequences. Forward (S) and reverse (AS) sequences of primers used for RT-PCR studies.

Gen		Secuencia	Temp (°C)
S100β	S	5'-CAG AGA CAC GGG CAT CCT TGA-3'	64
	AS	5'-GGG ATT AAG AGA GGG TCT GCT-3'	
CD90	S	5'-GCC TGA CCC GAG AGA AGA AGA AG-3'	60
	AS	5'-TGG TGG TGA AGT TGG CTA GAG TAA G-3'	
CD34	S	5'-ATG CCG GTC CAC AGG GGC-3'	60
	AS	5'-TCA CAG TTC TGT GTC AGC CA-3'	
GFAP	S	5'-GAT GGA GCG GAG ACG T-3'	55
	AS	5'-ACA CTG TAT GGC AAG GGC-3'	
p75NT	S	5'-CCT GCC TGG ACA ATG TTA CA-3'	55
R	AS	5'-GCC AAG ATG GAG CAA TAG AC-3'	
P₀	S	5'-TCT TTT ACC TGG CGC TAC CAG-3'	60
	AS	5'-GTT GAC CCT TGG CAT AGT GCA-3'	
MBP	S	5'-CAGAGACACGGGCATCCTTGA-3'	58
	AS	5'-GGGATTAAGAGAGGGTCTGCT-3'	

Inyección de las CMMO aisladas frescas

Luego de inducir la compresión transitoria del nervio ciático en ratas macho (ver punto 3.1.), las mismas fueron inyectadas con medio de cultivo conteniendo 15×10^6 CMMO (obtenidas y caracterizadas según se describe más abajo). Un grupo de animales fue transplantado con CMMOs marcadas con el trazador celular naranja *CMTMR* (*5-(and6)-(((4-choromethyl)benzoyl)amino)tetramethyl-rhodamine*). La inyección fue intravascular a través de la arteria caudal media y utilizando una aguja hipodérmica 21G. Además, se incluyó un grupo de ratas control a las que se les administró solución salina [347].

5. Análisis de la conducta del dolor (Proyecto III, IV)

5.1 Evaluación de alodinia mecánica

Método del 50% del umbral de retirada [348](Proyecto III).

Se determinó la sensibilidad al estímulo mecánico según el método de Chaplan. Luego de ser aclimatadas, se procedió con una serie de estimulaciones usando los filamentos de von Frey (1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 26g; monofilamentos de von Frey, Stoelting, WoodDale, IL, USA), empezando por el filamento de 6 g. Toda estimulación se realizó en la región central de la superficie plantar de la pata posterior del animal. Se aplicó el filamento con una presión suficiente como para curvarlo al hacer contacto con la superficie plantar del animal, y se mantuvo tal grado de presión por aproximadamente 5 segundos. En ausencia de una respuesta de retirada frente al filamento seleccionado inicialmente, se aplicó un estímulo más fuerte; en el caso de presentarse una respuesta de retirada, se aplicó el estímulo débil más próximo. Según Dixon y cols. (1980), el cálculo del umbral óptimo

mediante este método, requiere de 6 respuestas en las inmediaciones más cercanas al umbral del 50% [349]. En consecuencia y dado que el umbral es desconocido, el conteo de los 6 valores no comienza hasta no observar la primera respuesta de retirada. En ese punto, el conteo de 6 respuestas comienza 1 valor antes del pelo con el que se genera la primera respuesta de retirada y se completa la serie realizando 4 estimulaciones más ya sea en dirección ascendente o descendente. Por ende, utilizando este paradigma, el número total de respuestas registradas puede variar entre un mínimo de 4 (en el caso de que se observen respuestas de retirada con los 4 primeros pelos de manera descendente) a un máximo de 9 (en el caso de que se observe la primera respuesta de retirada en el pelo de 26 g).

El patrón resultante de respuestas positivas y/o negativas se tabuló, por convención, de la siguiente manera: X es retirada (positivo); 0 es no retirada (negativo), y el umbral de retirada del 50% se interpoló usando la fórmula:

$$\text{Umbral de retirada del 50\%} = (10^{(X_f + \kappa\delta)} / 10,000)$$

Donde X_f es el valor (en unidad log) del último filamento de Von Frey aplicado; κ es el valor de la tabla según el patrón de respuestas positivas/negativas; δ es la diferencia promedio (en unidades log) entre estímulos.

Método de aplicación en orden creciente de intensidad estimulatoria [350] (Proyecto IV).

Se evaluó la presencia de alodinia mecánica, entendiéndose esta como la respuesta motora refleja frente a un estímulo normalmente inocuo (agitación brusca

y/o lamido de la pata estimulada; vocalización). Luego de ser aclimatadas durante 15 minutos en cajas de acrílico transparentes apoyadas sobre un piso de tejido de alambre, se procedió con la estimulación de la superficie plantar de la pata de las ratas usando un set de monofilamentos de nylon calibrados, de grosor creciente (1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 26g, monofilamentos de von Frey, Stoelting, WoodDale, IL, USA). Cada monofilamento se aplicó 3 veces con intervalos de aproximadamente 5 seg. Toda estimulación se realizó en la región central de la superficie plantar de la pata posterior del animal. Se aplicó el filamento con una presión tal que indujera el curvado del mismo al hacer contacto con la superficie plantar del animal, manteniéndose tal grado de presión por aproximadamente 5 segundos. La retirada brusca de la pata fue tomada como una respuesta positiva para el dolor. El mismo proceso fue repetido 3 veces para cada pata (contra- e ipsilateral) con 5 minutos de espera entre cada una. El umbral de retirada fue determinado como aquella fuerza a la que el animal retiró la pata en las últimas dos de las 3 iteraciones estimulatorias. Asimismo, se consideró umbral de dolor en rango alodínico a aquel obtenido con 6g o menos de fuerza. El límite máximo de fuerza de los pelos utilizados fue de 26g.

5.2. Evaluación de la alodinia térmica

Sensibilidad al estímulo frío de la planta de la pata posterior [351](Proyecto III).

Luego de aclimatar a las ratas a la habitación y las cajas de testeo durante 15 a 30 minutos, se procedió a determinar la sensibilidad de las patas posteriores al estímulo frío, utilizando una versión modificada del método de Choi. Así, se aplicó sobre la superficie plantar de la pata posterior del animal una gota de acetona

formada en el extremo de una aguja de punta roma, evitando tocar la pata con la aguja. La falta de retirada de la pata se calificó con valor 0, y presencia de retirada con valor 1.

Siguiendo este método, se procedió a obtener la frecuencia de retirada de la pata frente al estímulo frío en períodos de 16 minutos, durante un total de 108 minutos. En cada período de 16 minutos, se produjo una estimulación cada 4 minutos (4 iteraciones), lo que permitió establecer la frecuencia de retirada en cada período. Esto determinó 7 períodos distribuidos en el tiempo que permitieron evaluar el efecto del agonista en estudio sobre la alodinia al frío. Cabe mencionar que el primer período debe ser considerado basal, previo a la administración del agonista.

Una vez finalizados todos los experimentos conductuales, los animales fueron profundamente anestesiados con hidrato de cloral y sacrificados.

6. Estudios electromiográficos (Proyecto IV)

Los estudios electromiográficos se realizaron 3, 7, 14, 21, y 60 días después de la lesión, mediante el uso de un equipo de electromiografía portátil (Cadwell Wedge Sierra II, Cadwell Labs, Inc., Kennewick, WA, EEUU). Luego de ser anestesiadas con ketamina (75 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), y de mantener la temperatura corporal a 37°C con una almohadilla eléctrica, se procedió a la inserción de electrodos en el músculo sóleo y el electrodo tierra en la cola de las ratas en estudio. Luego de exponer el nervio ciático ipsilateral, se procedió a la estimulación de las áreas proximal y distal a la compresión. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para los nervios contralaterales y control. La intensidad del

estímulo fue de 30 mA y se observó una pequeña contracción en todas las ratas. Se registró la latencia distal y la amplitud del complejo del potencial de acción del músculo.

7. Análisis inmunohistoquímico

7.1. Preparación de las muestras

Fijación y criopreservación

Los animales destinados a estudios de inmunohistoquímica fueron anestesiados en forma terminal utilizando hidrato de cloral (Proyecto II) o una mezcla de ketamina y xilazina (Proyecto IV), administrada por la vía i.p., y perfundidos a través de la aorta ascendente. En el Proyecto II, primero, se inyectó buffer Tyrode a 37°C, seguido de una mezcla de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0,2% disueltos en buffer fosfato 0,16 M (pH 6,9) (Pease, 1962; Zamboni and De Martino, 1967) a 37°C y luego el mismo fijador a 4°C. En el Proyecto 4, los animales fueron sacrificados 7 o 14 días después de la lesión. Se inició la perfusión con PBS a 37°C seguido de una solución fijadora (4% paraformaldeído en 1 x de PBS, pH 7) a 4°C. Seguidamente, los tejidos fueron disecados rápidamente y sumergidos en el mismo fijador durante 90 min a 4°C y posteriormente en sucrosa al 10-20% disuelta en PBS (pH 7,2) por no menos de 24 horas. El tejido así preparado fue congelado en bloques y seccionado usando un criostato (Microm, HM 505E, GMI, Ramsey, Minnesota, USA) a 12-20 µm de grosor, según el tipo de tejido. Las secciones así obtenidas se montaron en vidrios histológicos gelatinizados.

7.2. Técnicas de inmunohistoquímica

Inmunomarcación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) y coloración por diaminobenzidina [352] (Proyecto II)

Las secciones fueron incubadas en una cámara húmeda a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios por 24 hs (ver Tabla M.M1). Luego, las secciones fueron incubadas a TA por 60 min con los anticuerpos secundarios correspondientes (ver Tabla M.M1). Finalmente, las secciones se incubaron con los reactivos del kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por una hora a TA. Seguidamente, se demostró la actividad de la peroxidasa presente utilizando la técnica de intensificación por níquel de la *diaminobenzidina (DAB)*. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas y cubiertas con cubreobjetos usando Bálsamo de Canadá (Biopack, Buenos Aires, Argentina).

Inmunofluorescencia (Proyecto IV)

Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, secadas 1 hora y lavadas dos veces en solución de PBS, dos veces en PBS-Tritón X-100 al 0,1%, y posteriormente incubadas en FCS al 5% en PBS por al menos 2 hs a TA. Las secciones fueron incubadas durante 18 – 24 hs en una cámara húmeda a 4°C con MBP anti-rata (1/400, IgG policlonal de conejo), y medio condicionado de la línea celular de un hibridoma RT-97 contra NF-200 (marcador axonal, 1/10, IgG de ratón, donado generosamente por el Dr. Monje de The Miami Project to Cure Paralysis, Miami, EE.UU). Las muestras fueron lavadas dos veces en PBS e incubadas a TA por 2 hs de manera correspondiente con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo Cy3 o burro anti-ratón (1/200) (ver tabla M.M1) más Hoechst 32258 (2

µg/ml en PBS, Sigma Chem Co, Spruce, St Louis, Missouri, USA) para la detección de núcleos y luego lavadas dos veces en PBS. Las secciones fueron montadas con el medio de montaje fluorescente Dako.

8. Hibridación *in situ* (Proyecto I)

Los GARDs lumbares 4 y 5, contra- e ipsilaterales, así como también segmentos toracolumbares, lumbares y lumbosacros de la médula espinal fueron rápidamente extraídos de ratones previamente anestesiados y decapitados, y congelados usando hielo seco. Luego, el tejido se incluyó en O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura, Torrance, CA, USA) y se mantuvo a -20°C hasta el momento de ser usado. Las secciones de los GARDs y la médula espinal fueron cortadas usando un crióstato (12 o 20 µm de espesor, respectivamente), montadas en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y guardadas a -20°C hasta la hibridación.

Llegado el momento, se procesaron secciones adyacentes de los diferentes tejidos mediante hibridación *in situ* para la localización del ARNm de los VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3. En todos los casos, las sondas de ARNc marcadas con azufre (S)³⁵ fueron utilizadas de acuerdo a protocolos previamente publicados [353, 354]. Se prepararon sondas de ARNc sentido y antisentido complementarias a la región codificante del VGLUT1 de ratón (nucleótidos 855–1788; número de acceso a GenBank XM_133432.2), VGLUT2 (nucleótidos 848–2044; número de acceso a GenBank NM_080853.2) (Nakamura et al., 2007) y el VGLUT3 (nucleótidos 1511–1768; número de acceso a GenBank BB650431 y BB396899; Schäfer et al., 2002) mediante transcripción *in vitro*, luego de la linearización de constructos de ADNc,

utilizando polimerasas de ARN apropiadas (T3, T7 o SP6) y 35S-UTP (Perkin–Elmer, Chelton, CT, USA). Después del secado y fijación, las secciones fueron incubadas durante 18-24 horas a -60°C en un cóctel de hibridación que contiene sondas de ARNc marcadas con S³⁵ a una concentración de 1.0 x 10⁶ cpm/50 µl por portaobjeto [353, 354].

Para tratamiento posthibridación, las secciones fueron lavadas varias veces en *citrato de sodio-salino (CSS)* 4 x (1xCSS 1/4 0,015 M de citrato de sodio, 0,15 M de cloruro de sodio a un pH de 7) adicionado con tiosulfato de sodio 10 mM a 37°C. Luego, las secciones fueron incubadas en ribonucleasa A (0.05 mg/mL) por 30 min a 45°C. Esto fue seguido de varios lavados en concentraciones decrecientes de CSS (2X, 0,5X, y 0,1x) a 37°C. Todos, excepto el último lavado, también contuvieron 10mM de tiosulfato de sodio. Después de la posthibridación, las secciones fueron brevemente enjuagadas en *agua destilada (dH₂O)*, inmersas en 95% de etanol, secadas al aire, inmersas en emulsión de trazado nuclear tipo NTB (Kodak, Rochester, NY, USA; 1:1 in dH₂O), secadas al aire y expuestas en cajas oscuras herméticamente cerradas a 4°C. Las secciones hibridadas con las sondas del VGLUT1 o VGLUT2 fueron expuestas por 5-7 días, mientras que las hibridadas con sondas del VGLUT3 fueron expuestas durante 3-5 semanas (GARDs y médula espinal). Las soluciones D19 (Kodak) y Rapidfix (Kodak) fueron utilizadas para el revelado y fijación de las secciones inmersas en emulsión NTB, respectivamente. Finalmente, todas las secciones fueron contrateñidas con violeta de cresilo (Sigma) y cubiertas con solución de montaje con DPX (Fluka, Buchs, Switzerland) [353, 354].

Los controles de especificidad incluyeron: 1) el pre-tratamiento de algunas secciones con ribonucleasa A (0.05 mg/ml) por 30 minutos a 45°C antes de la hibridación con sondas de ARNc marcadas con S³⁵; 2) la hibridación usando sondas-sentido de ARNc marcadas con S³⁵ contra cada VGLUT; 3) la incubación de varias secciones de tejido en cóctel de hibridación desprovisto de sondas radioactivas como un control de la quemografía [353, 354]. No se observó ningún marcado específico bajo estas condiciones control.

9. Microscopía y procesamiento de imágenes (Proyecto I, II y IV)

Las secciones de los Proyectos I y II fueron examinadas con un microscopio Nikon Eclipse E800 equipado con objetivos y filtros apropiados para la visualización de los campos claro y oscuro. El DAPI (Proyecto II) fue visualizado utilizando filtros UV e iluminación con fluorescencia. La toma de las microfotografías en los Proyectos I y II, se realizaron con una cámara U2 Nikon Digital (Nikon, Tokyo, Japón).

En el proyecto IV, las secciones semifinas de tejido se montaron en portaobjetos y se tiñeron con una solución de azul de toluidina al 0,5% en carbonato de sodio al 2,5% (p/v). Las secciones ultrafinas se recolectaron en un tejido de cobre con 300 grillas, se tiñeron con uranilo acuoso al 2% (p/v) y solución de Reynolds. Las secciones ultrafinas fueron analizadas con un microscopio electrónico Zeiss EM 109T (Zeiss, Jena, Alemania). En cambio, para visualizar los tejidos procesados con inmunofluorescencia se utilizó un microscopio confocal Olympus FV1000 y un microscopio de epifluorescencia Olympus BX100 (Olympus, Center Valley, PA, USA).

La resolución, el brillo y el contraste de las imágenes (Proyectos I y II) fueron optimizados usando el programa Adobe Photoshop CS3 (Adobe System Inc., San Jose, CA, USA). En el proyecto IV, las fotografías se obtuvieron mediante el uso de una cámara Kodak 5301 y sus correspondientes films, y una cámara digital Epson Perfection V500 Photo scanner o una cámara digital (GAETA).

10. Cuantificación y análisis de imágenes

10.1. Ganglios anexos a la raíz dorsal (Proyectos I y II)

Cuantificación de los perfiles neuronales

Se procedió a la cuantificación del número de *perfiles neuronales (PNs)* en los GARDs que expresaran un marcador de interés (para más detalle sobre los marcadores utilizados referirse a los Proyectos I y II). Los PNs fueron contados en secciones distanciadas al menos por 50 micrómetros. Sólo se cuantificaron los PNs nucleados, los cuales fueron puestos en evidencia mediante la marcación con violeta de Cresilo (Proyecto I) o con DAPI (Proyecto II).

Luego, en ambos Proyectos, se obtuvieron los porcentajes de los PNs que expresaran los diferentes marcadores, comparando con el número total de los PNs teñidos con DAPI o violeta de Cresilo. De este modo, se obtuvieron porcentajes de neuronas que expresan un determinado marcador, tanto en ganglios de animales control, como en aquellos provenientes de animales lesionados.

Análisis del tamaño celular (Proyectos I y II)

La distribución de la expresión de los VGLUTs fue evaluada en función del tamaño neuronal de las neuronas de los GARDs. Para ello, se midió el área de los

cuerpos celulares de una muestra representativa de PNs que expresaron cada VGLUT usando el programa del NIH de dominio público, ImageJ (desarrollado en U.S. National Institutes of Health y disponible en internet en el sitio <http://rsb.info.nih.gov/nihimage/>).

10.2. Médula espinal (Proyecto II)

Se evaluaron los cambios en la expresión de diferentes marcadores en el asta dorsal lumbosacra, comparando los lados ipsilaterales y contralaterales, y mediante el análisis del área ocupada por fibras inmunorreactivas.

Se tomaron fotografías de alta resolución de las astas dorsales contra- e ipsilaterales. Luego, utilizando el programa Photoshop, se seleccionaron 3 áreas (lateral, central y medial) de 1 – 1.5 cm² del asta dorsal superficial. Estas fotos se acoplaron en una sola imagen y se guardaron para ser utilizadas con el programa Image J (descrito más arriba). Luego de ser abiertas con Image J, se midió el área total seleccionada más el área ocupada por fibras nerviosas teñidas con el marcador de interés. Este análisis se realizó en 5 – 7 secciones de la médula espinal, separadas por 10 – 20 secciones de 20 µm de espesor, de todos los animales experimentales. Los datos obtenidos se transfirieron a una hoja de Excel y se obtuvieron los porcentajes del área teñida comparando con el área total evaluada por grupo y por animal.

10.3. Nervio ciático (Proyecto IV)

Para el análisis de secciones semifinas se utilizó el software Image Pro Plus. El número total de axones/100 µm² se calculó en 30 campos seleccionados de

manera aleatoria. En secciones ultrafinas, se calculó el grosor de la línea de densidad mayor, la línea intraperiódica y la vaina de mielina. También se analizó el número de vainas de mielina en 100 nm y el g-ratio (diámetro del axón/diámetro del axón incluyendo la vaina de mielina).

11. Desarrollo de liposomas multivesiculares (Proyecto V)

11.1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes lípidos: *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)*, *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG)*, trioleína y colesterol (todos adquiridos de Sigma, St. Louis, MO, USA). Para los ensayos de encapsulamiento se utilizó: rojo Ponceau-S (Sigma, St. Louis, MO, USA), cloroformo (Merck, Darmstadt, Germany), sal ácida disódica disulfónica 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno- conocida como Bodipy (Molecular Probes, Life Technology), glucosa (Sigma, St. Louis, MO, USA), L-lisina (Sigma, St. Louis, MO, USA). La morfina fue donada por el departamento de Farmacia del Hospital Austral, habiendo mediado receta por triplicado firmada por el Dr. Harry Trigoso Venario.

11.2. Preparación de los LMVs

Se utilizó la metodología descrita por [338] (Patente US5807572 A). En este procedimiento se genera una doble emulsión agua-aceite-agua denominada también w-o-w (del inglés water in oil in water). Para esto se realizó una primera emulsión a partir de la mezcla de una solución orgánica que contiene los lípidos DOPC, DPPG, trioleína y colesterol disueltos en cloroformo en una relación molar de 7:1:1:11, y

una segunda solución acuosa conteniendo la droga o sustancia que será encapsulada. Se partió de igual volumen (2ml) de ambas soluciones y mezclándolas en un vial de vidrio con agitación en una plataforma vibratoria de un vortex durante 6 minutos a revoluciones máximas (Velp Scientifica, Usmate, Italia) o con un homogeneizador (Janke & kunkel Ika-werk Ultra Turrax Thyristor Regler Tr50). A continuación se preparó una solución de volumen equivalente de L-lisina 40 mM y glucosa 4% que se agregó al mismo vial y se colocó nuevamente en el vortex por unos 10 seg a máximas revoluciones. En este momento se observó que en la solución se producen microesférulas (de cloroformo) que contienen los LMVs. A continuación, la emulsión fue vertida en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml que contiene nuevamente un volumen equivalente de L-lisina 40 mM y glucosa 3,5%. Posteriormente, se eliminó el cloroformo de la preparación mediante el secado con un flujo de nitrógeno gaseoso por aproximadamente 20 minutos. La solución remanente conteniendo los LMVs fue trasvasada a tubos de vidrio de 15 ml y centrifugada a 600g por 5 minutos. Se separó el pellet del sobrenadante, y se descartó este último ya que contiene la solución no encapsulada. El pellet conteniendo los LMVs fue resuspendido en una solución de NaCl 0,9%.

11.3. Encapsulado de drogas patrones en los LMVs

En ambos casos se realizó una curva de calibración registrando las absorbancias para el rojo Ponceau-S o emisiones de fluorescencias para el Bodipy a partir de diluciones seriadas de una solución madre al 0,1% (p/v). Las medidas se hicieron por duplicado descartando el segmento no lineal de la curva de calibración. Las mediciones se realizaron utilizando una placa de 96 pocillos en un lector de

multimodo (Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detector, Brea, CA, USA). El cálculo del porcentaje de encapsulación se realizó mediante el método indirecto que consiste en determinar el porcentaje de solución encapsulada, determinando el % de la sustancia no encapsulada. Para esto, la muestra se centrifuga previamente a 10000 rpm y se determina la absorbancia del sobrenadante. En los casos donde fue necesario, se realizaron diluciones para obtener valores que entren en el rango lineal de la curva de calibración realizada. Se aplicó la siguiente fórmula, para calcular el % de encapsulamiento:

$$\frac{Mg0 - Mg\ abs}{Mg0} \times 100 = \%encapsulado$$

donde *Mg0* es la masa teórica a encapsular y *Mg abs* es la masa encontrada en el sobrenadante de la preparación de los liposomas.

11.4. Ensayo de estabilidad y liberación

El ensayo de liberación tiene como objetivo analizar la cinética de liberación del sistema en estudio. En este caso, los LMVs obtenidos según el protocolo descrito en 3.3 se re-suspendieron en un tubo de vidrio, en un volumen entre 3 y 6 ml. Se tomaron alícuotas de 100 µl cada 24h que se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm. Se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de rojo Ponceau-S en esta solución. Una vez obtenida la absorbancia correspondiente se re-suspendió nuevamente el pellet y se devolvió al tubo original, de modo de no variar el volumen total. El ensayo de liberación se realizó a 37°C en agitación constante (50 rpm) durante el término de 10 días. De manera paralela, se realizaron ensayos de estabilidad para lo cual las preparaciones de LMVs se conservaron en la heladera a 4°C durante los días del ensayo de liberación. Se tomó una alícuota una vez por

día y se procedió de la misma manera que la descrita en el punto 3.3. El % de liberación (%P) se calculó a partir de:

$$\%P = \frac{Mg\ t \times vol.\ disolución}{Mg\ e} \times 100$$

donde *Mgt* son los miligramos obtenidos a un tiempo específico en horas, *vol. disolución* es el volumen en donde la muestra se encuentra suspendida y *Mg e* es la droga encapsulada. Una vez obtenido este porcentaje, se calculó el % de liberación acumulado a partir de la siguiente ecuación:

$$\%P\ acumulado = \left(\frac{Vol.\ muestra}{Vol.\ disolución} \times (Pt - 1) \right) + Pt$$

donde *Vol. muestra* es el volumen tomado para ser medido, *Vol. Disolución* es el volumen del cual se obtuvo la muestra (*Pt-1*) es el %P de la medida anterior y *Pt* el %P del tiempo en el cual se está tomando la muestra. Por otro lado, se obtuvieron imágenes a partir de las cuales se calculó el tamaño de los LMVs. Se utilizó un microscopio invertido con cámara fotográfica adosada (Olympus). Las imágenes fueron obtenidas con aumentos de 25X, 40X y 60X, utilizando el mismo software a partir del cual se tomaron las imágenes.

11.5. Encapsulación de morfina y ensayos de liberación

Se utilizó una solución de morfina 10 mg (5mg/ml) y se siguió el protocolo de encapsulación y medida de cinética de liberación descrito en los puntos 11.3 y

11.4, respectivamente. De manera paralela, se realizó una curva de calibración de morfina, para lo cual se partió de una solución de 5mg/ml, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas hasta llegar a una concentración de 1,2µg/ml, siendo lineal solo la región comprendida entre los 1,2µg/ml hasta los 150µg/ml. Se determinó la absorbancia a 285nm.

12. Análisis estadístico

En el proyecto I, los datos fueron presentados como promedio \pm SEM y analizados por medio de métodos paramétricos. Las diferencias en el porcentaje de los PNs de los GARDs positivos para cada marcador en estos capítulos, entre los lados contra- e ipsilateral para cada grupo de estudio, fueron testeadas utilizando el *test de análisis de varianza (ANOVA)*, seguido de un test de comparación múltiple de Tukey's HSD cuando ANOVA diera un resultado significativo. El valor $P < 0,05$ fue considerado como significativo. En el caso del análisis de tamaños de los PNs de los GARDs en estudio, también se presentaron los datos de promedio y mediana para su comparación mediante el análisis presentado anteriormente.

En el proyecto II, los datos fueron presentados como promedio \pm SEM y analizados utilizando el test *t* de Student no-pareado. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

En el proyecto III, el análisis estadístico de ambos tipos de conducta (mecánica y térmica) se condujo de la siguiente manera: 1) Análisis de las curvas de cada dosis a lo largo del tiempo experimental, comparando cada punto (alodinia mecánica) o período (alodinia al frío) de tiempo evaluado con el valor basal obtenido a los 0 min o el período 0-16 min, respectivamente; 2) Análisis

comparativo entre curvas a cada punto o período de tiempo evaluado; 3) Análisis del área bajo la curva (ABC) para cada dosis estudiada y sus respectivas comparaciones. El análisis estadístico incluyó el empleo de: 1) Test de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (dosis y tiempo) para la comparación de todas las curvas; 2) Test de análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de los efectos de cada dosis a cada tiempo o período evaluado, efectos para cada dosis en los diferentes tiempos evaluados respecto del valor basal, y análisis de área bajo la curva. En todos los casos, los tests ANOVA se siguieron del test posthoc de Tukey para la comparación entre grupos, tiempos o períodos.

En el proyecto IV se utilizaron métodos no-paramétricos para analizar el efecto de la conducta dolorosa. Se usó el test de Wilcoxon (Matched Pairs) para la comparación entre lados contra- e ipsilateral del umbral de retirada de todos los grupos. Además se analizaron estadísticamente los efectos del tratamiento a cada tiempo de sobrevida usando el test de Kruskal-Wallis, seguido de un test de comparación múltiple de Dunn's, cuando el test de Kruskal-Wallis diera significativo. Para el análisis estadístico de datos paramétricos (cuantificación axonal en cortes semifinos, electrofisiología) se utilizó el ANOVA, seguidos por el test de Dunnett o Tukey.

Los niveles de significancia en todos los casos se presentan como sigue:
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

En el proyecto V las liberaciones de sustancias encapsuladas en vehículos se ajustaron a distintos modelos matemáticos con el fin de analizar las cinéticas de las liberaciones. Los modelos mas utilizados para caracterizar estos sistemas de liberación incluyen el modelo de cinética de primer orden, el modelo de Higuchi, el

modelo de Hixon Crowel, modelo de Peppas y su derivación Rigstar Peppas [355]. Las ecuaciones de los modelos se observan en la Tabla M.M3. Los gráficos y los cálculos de rectas y coeficientes de correlación fueron realizadas con Excel.

Tabla M.M3. Modelos matemáticos para el ajuste de cinéticas de liberación.

Table M.M3. Mathematical models for the adjustment of release kinetics.

Modelo	Ecuación
Primer Orden	$\text{Log}(1-Q) = -kt$
Higuchi	$Q = kt^{1/2}$
Hixon Crowell	$(1-Q)^{1/3} = -kt$
Rigtar Peppas	$\text{Log}P = C + k \log t$

RESULTADOS

Proyecto I. Expresión del transcripto de los transportadores vesiculares de glutamato en ganglios anexos a la raíz dorsal lumbares y médula espinal de ratón – Efectos de la axotomía periférica o la inflamación de la pata trasera

Expresión del ARNm de los VGLUTs en PNs de los GARDs

Se detectó la presencia de transcritos para cada VGLUT en PNs de los GARDs que no estaban lesionados, mostrándose en diferentes proporciones. Así, al considerar la expresión global del transcritos para cada VGLUT en GARDs L4-5 contralaterales de ratones control, el VGLUT₁ se expresó en $\sim 44,7 \pm 4,2\%$, el VGLUT₂ en $\sim 69,1 \pm 3,7\%$, y el VGLUT₃ en $\sim 17,1 \pm 0,7\%$ de los PNs (Tabla PI.1; Figura PI.1A, D, G). La mayoría de los PNs positivos para el ARNm del VGLUT₁ fueron de tamaño mediano y grande, entre 247 y más de 2469 μm^2 , con un promedio de tamaño de 987 μm^2 y una mediana de 952 μm^2 ; una gran proporción de estos PNs midió entre 500 y 1200 μm^2 (Figuras PI.1B y PI.2A). Los PNs que expresaron el ARNm del VGLUT₂ mostraron una amplia distribución que se extiende desde 54 a 2810 μm^2 con un promedio de tamaño de 665 μm^2 y una mediana de 602 μm^2 ; la mayoría de los PNs midió entre 200 y 1100 μm^2 (Figuras PI.1E y PI.2B). Finalmente, el ARNm del VGLUT₃ se detectó en PNs de pequeño y mediano tamaño que se encuentran entre 64 y 1811 μm^2 , con un promedio de tamaño de 459 μm^2 y una mediana de 433 μm^2 ; la mayoría de los PNs midió entre 200 y 600 μm^2 (Figuras PI.1H y PI.2C).

La incubación con la ribosonda sentido de cada VGLUT resultó en ausencia de hibridación específica para VGLUT₁ (Figura PI.1C), VGLUT₂ (Figura PI.1F) o VGLUT₃ (Figura PI.1I).

Expresión del ARNm de los VGLUTs en la médula espinal

Se detectó la presencia del ARNm del VGLUT1 en tan sólo dos localizaciones de los segmentos medulares analizados. En el segmento toracolumbar se observó

una pequeña población de PNs positivos para el ARNm del VGLUT₁ de manera casi exclusiva en la región dorsomedial de la tal llamada zona intermedia del asta posterior (láminas IV – V) (Figura. PI.3A). Además, se observaron PNs aislados positivos para el ARNm de VGLUT₁, en regiones profundas del asta dorsal (láminas III – IV) en segmentos lumbares (Figura PI.3B) o toracolumbares (Figuras PI.4A – C). Por el contrario, no se observaron PNs positivos para el ARNm de VGLUT₁ en segmentos lumbosacros (Figura PI.3C).

Se observaron numerosos PNs positivos para el ARNm de VGLUT₂ en todos los segmentos medulares analizados. En el asta dorsal, las neuronas que distintivamente expresaron el ARNm del VGLUT₂ fueron visualizadas en la lámina I y láminas más profundas (láminas III – VI) (Figuras PI.3E – G y PI.5A – C). Por el contrario, las láminas II – III exhibieron una señal de hibridización más difusa para el ARNm del VGLUT₂ (Figuras PI.3E – G y PI.5A), correspondiendo virtualmente siempre a PNs. Además, se detectaron numerosas neuronas positivas para el ARNm del VGLUT₂ en el área X y en la porción medial de las astas ventrales (Figuras PI.3E – G y PI.5A, D, E). Sin embargo, y especialmente en las partes laterales de las astas ventrales en el ensanchamiento lumbar, pareciera haber ausencia de neuronas positivas para el ARNm del VGLUT₂ (Figuras PI.3F y PI.5A, E).

Se observó un pequeño número de neuronas positivas para el ARNm del VGLUT₃, aunque débilmente marcadas, en las astas dorsales (principalmente en las láminas III – IV) de los segmentos toracolumbar, lumbar y lumbosacro de la médula espinal.

En todos los casos en la médula espinal, la incubación con una ribosonda sentido correspondiente a cada VGLUT resultó en la ausencia de señal específica de hibridación (Figura PI.3D, H, L).

Efectos de la axotomía (7 días de sobrevida) o la inflamación de la planta de la pata posterior (1 o 3 días de sobrevida)

Se observó una discreta pero significativa reducción del número de PNs positivos para el ARNm del VGLUT3 (ANOVA de un solo factor, $P = 0,0334$; AXO ipsilateral $12,8 \pm 0,4\%$ vs. AXO contralateral $17,8 \pm 1,6\%$, Tukey's, $P < 0,05$; Tabla PI.1; Figura PI.7E, F), mientras que el número de PNs de los GARDs L4-5 positivos para el ARNm del VGLUT1 (Figura PI.7A, B) y el VGLUT₂ (Figura PI.7C, D) permaneció inalterado luego de la axotomía del nervio ciático (Tabla PI.1).

No se observaron cambios evidentes en el porcentaje de PNs de los GARDs L4-5 positivos para el ARNm del VGLUT1 o el VGLUT2 luego de 1 o 3 días de inflamación de la planta de la pata posterior del animal. El mismo resultado se obtuvo para los VGLUT3, aunque el análisis de ANOVA de un solo factor mostró una pequeña diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,0491$) luego de un día de inflamación de la superficie plantar de la pata posterior. A pesar de esto, el resultado no fue respaldado por el análisis post-hoc entre grupos. De la misma manera, ninguna de las lesiones mostraron cambios evidentes en el número de PNs positivos para el ARNm de los VGLUTs en la médula espinal (estos datos no se presentan).

Tabla PI.1. Tabla que muestra los resultados de la cuantificación de VGLUTs en ratones control o bajo diferentes condiciones de dolor crónico. Sólo el ARNm del VGLUT3 muestra cambios luego de la axotomía del nervio ciático. Porcentaje de neuronas de los GARDs que expresan el transcripto de VGLUT1, VGLUT2 o VGLUT3, luego de 7 días de axotomía del nervio ciático o luego de 1 o 3 días de la inflamación por CFA. También se incluyen animales control. Para proveer el porcentaje global de neuronas que expresaron cada uno de los VGLUT en condiciones normales, se combinaron y promediaron los valores de los GARDs contralaterales de los animales control. Los valores se expresan como promedio \pm SEM.

Table PI.1. Table showing the quantification of VGLUTs in control mice and mice after with different chronic pain conditions. Only VGLUT3 mRNA exhibits changes after axotomy of the sciatic nerve. Percentage of DRG neurons expressing either VGLUT1, VGLUT2 or VGLUT3 transcript, after 7-day sciatic nerve axotomy or 1- or 3-day CFA injuries. Sham animals were also included. To provide the global percentage of neurons expressing each VGLUT in normal conditions, the values from contralateral DRGs in sham animals were combined and averaged accordingly. Values are expressed as mean \pm SEM.

	VGLUT ₁		VGLUT ₂		VGLUT ₃	
	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Axotomía 7 días	42.1 ± 0.4 (n=4)	42.5 ± 0.9 (n=4)	66.5 ± 1.7 (n=4)	69.3 ± 1.0 (n=4)	12.8 ± 0.4 (n=5)*	17.8 ± 1.6 (n=5)
Control	40.3 ± 1.0 (n=4)	42.8 ± 1.4 (n=4)	68.9 ± 1.0 (n=4)	65.7 ± 1.8 (n=4)	15.1 ± 0.5 (n=5)	15.7 ± 1.1 (n=5)
Inflamación 1 día	52.2 ± 0.6 (n=3)	51.5 ± 1.6 (n=3)	78.7 ± 1.6 (n=3)	76.1 ± 0.8 (n=3)	16.1 ± 0.9 (n=5)	14.4 ± 0.3 (n=5)
Control	51.3 ± 2.4 (n=3)	52.8 ± 0.8 (n=3)	78.9 ± 1.7 (n=3)	76.6 ± 2.0 (n=3)	14.0 ± 0.7 (n=5)	17.6 ± 1.4 (n=5)
Inflamación 3 días	38.4 ± 0.8 (n=4)	41.8 ± 1.8 (n=4)	64.9 ± 1.8 (n=4)	66.0 ± 2.5 (n=4)	16.4 ± 0.9 (n=5)	17.6 ± 1.3 (n=5)
Control	41.0 ± 1.2 (n=3)	38.8 ± 0.9 (n=3)	62.3 ± 3.2 (n=3)	64.7 ± 1.8 (n=3)	16.1 ± 1.2 (n=5)	18.4 ± 0.6 (n=5)
Porcentaje global	44.7 ± 4.2		69.1 ± 3.7		17.1 ± 0.7	

* (P < 0.05) cuando se comparan los GARDs contra vs. ipsilateral luego de 7 días de axotomía.

Figura PI.1 Los transcritos de los VGLUTs se expresan abundantemente en los GARDs L4 – 5. Microfotografías de campo oscuro (A, D, G) y campo claro (B, C, E, F, H, I) de secciones de los GARDs contralaterales de animales control, hibridadas con ribosondas ‘antisentido’ (A, B, D, E, G, H) y ‘sentido’ (C, F, I) contra VGLUT1 (A – C), VGLUT2 (D – F) o VGLUT3 (G – I). Los recuadros en A, D, G se muestran magnificados en B, E, H. (A, B) Se observan (A) muchos PNs positivos para el ARNm de VGLUT1 en los GARDs, siendo estos usualmente de tamaño grande y mediano (doble cabeza de flecha blancas en B). También se encuentran algunos PNs positivos para el ARNm de VGLUT1 de pequeño a mediano tamaño (doble cabeza de flecha negra en B). Los asteriscos en (A) y las cabezas de flecha en (B) indican PNs negativos para el VGLUT1. (D, E) Hay abundantes PNs positivos para el ARNm de VGLUT2 en los GARDs (D). Muchos son de pequeño tamaño (doble cabeza de flecha negra en E), aunque muchos otros son de tamaño mediano y grande (doble cabeza de flecha blanca en E). Los asteriscos en (D) y las cabezas de flecha en (E) indican PNs negativos para el VGLUT2. (G, H). Se observa un modesto número de PNs positivos para el ARNm de VGLUT₃ (G), por lo general de pequeño tamaño (doble cabeza de flecha blanca en H). Las cabezas de flecha en (H) indican PNs negativos para el VGLUT3. (C, F, I) La hibridación con la ribosonda control ‘sentido’ para cada uno de los VGLUTs no mostró ninguna señal específica para VGLUT1, VGLUT2 o VGLUT3 (C, F, I, respectivamente). Sin embargo, se observó mucho fondo en secciones hibridadas con ribosondas ‘antisentido’ (G, H) y ‘sentido’ (I) para el VGLUT3, probablemente debido a un mayor tiempo de exposición necesario para la visualización de la señal del VGLUT3. Barras de escala = 100 μm (G = A, D; I = B, C, E, F, H).

Figure. PI.1 VGLUTs transcripts are abundantly expressed in L4–5 DRGs. Dark- (A, D, G) and bright-field (B, C, E, F, H, I) photomicrographs of sections of contralateral DRGs from sham mice, hybridized with ‘antisense’ (A, B, D, E, G, H) and ‘sense’ (C, F, I) riboprobes against VGLUT1 (A–C), VGLUT2 (D–F) and VGLUT3 (G–I). Boxes in A, D, G are shown at higher magnification in B, E, H. (A, B) Many VGLUT1 mRNA-positive DRG NPs are observed (A), and these are usually large and medium-sized (white double arrowheads in B). Some small to medium-sized VGLUT1 mRNA-positive NPs are also found (black double arrowheads in B). Asterisks in (A) and arrowheads in (B) show NPs negative for VGLUT1. (D, E) Abundant VGLUT2 mRNA-positive NPs are present in DRGs (D). Many exhibit small size (black double arrowheads in E), although several others are large and medium-sized (white double arrowheads in E). Asterisks in (D) and arrowheads in (E) show NPs negative for VGLUT2. (G, H). A modest number of VGLUT3 mRNA-positive NPs is detected (G), usually being of small size (white double arrowheads in H). Arrowheads in (H) show NPs negative for VGLUT3. (C, F, I) Hybridization with the control ‘sense’ riboprobe for each VGLUT revealed no specific signal for VGLUT1, VGLUT2, or VGLUT3 (C, F, I, respectively). However, a higher background was noticed in sections hybridized with both antisense (G, H) and sense (I) VGLUT3 riboprobes, likely due to the longer exposure times necessary for VGLUT3. Scale bars=100 μm (G=A, D; I=B, C, E, F, H).

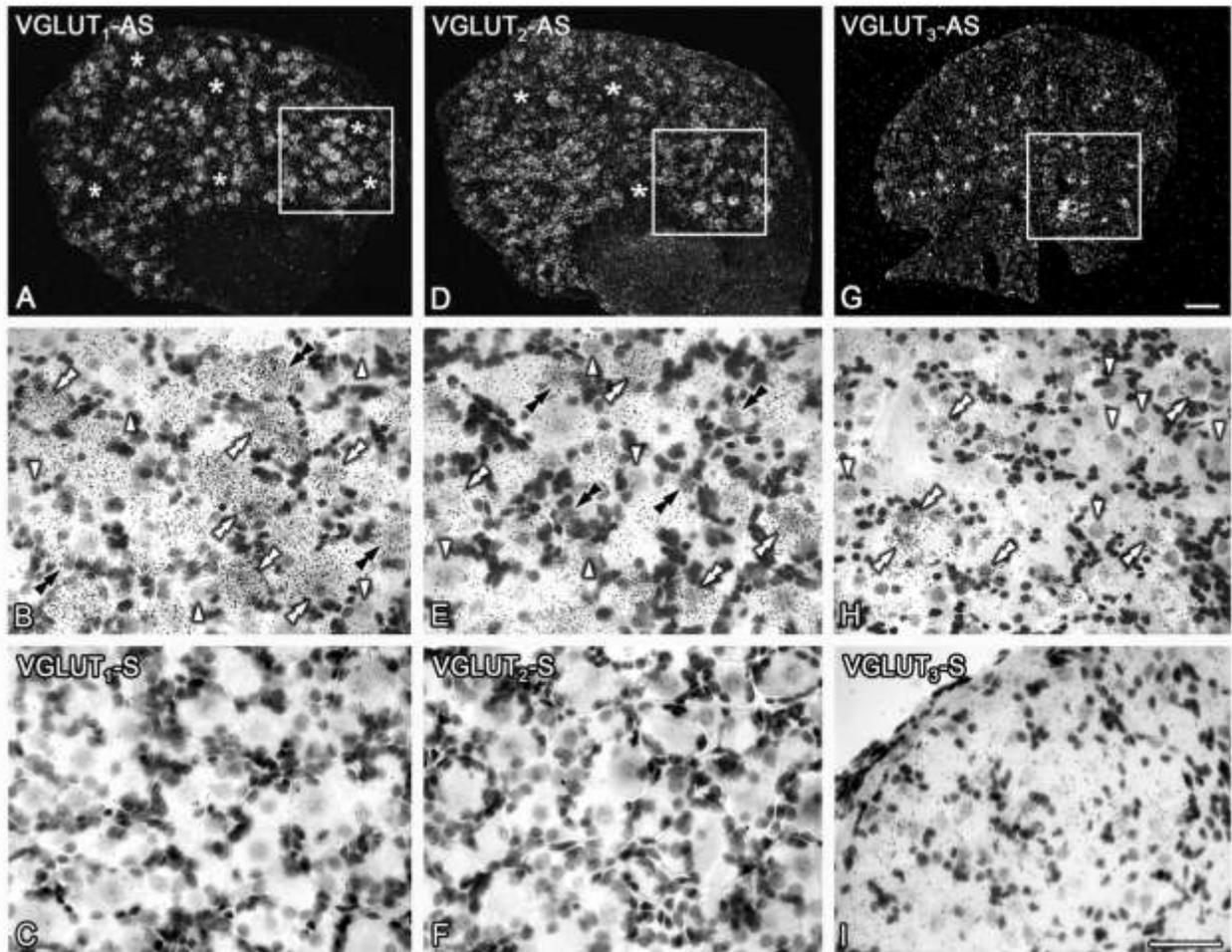


Figura PI.2. Los transcritos de los VGLUTs presentan diferentes patrones de distribución de tamaño. Los gráficos muestran la distribución de los tamaños de los PNs de las neuronas de los GARDs positivas para el ARNm del VGLUT1 (A), VGLUT2 (B) o VGLUT3 (C). (A) La mayoría de los PNs positivos para el ARNm del VGLUT₁ son de tamaño mediano a grande. (B) Los PNs positivos para el ARNm del VGLUT2 muestran un amplio patrón de distribución, yendo desde tamaños grandes, medianos a pequeños. (C) La mayoría de los PNs positivos para el ARNm del VGLUT3 son de tamaño mediano a pequeño.

Figure PI.2. VGLUTs transcripts exhibit different size-distribution patterns. Graphs showing the size distribution of VGLUT1- (A), VGLUT2- (B) or VGLUT3 (C) mRNA-positive DRG NPs. (A) Most VGLUT1 mRNA-positive NPs are large to medium-sized. (B) VGLUT2 mRNA-positive NPs show a widespread distribution, including large, medium-sized and small NPs. (C) Most VGLUT3 mRNA-positive NPs are small to medium-sized.

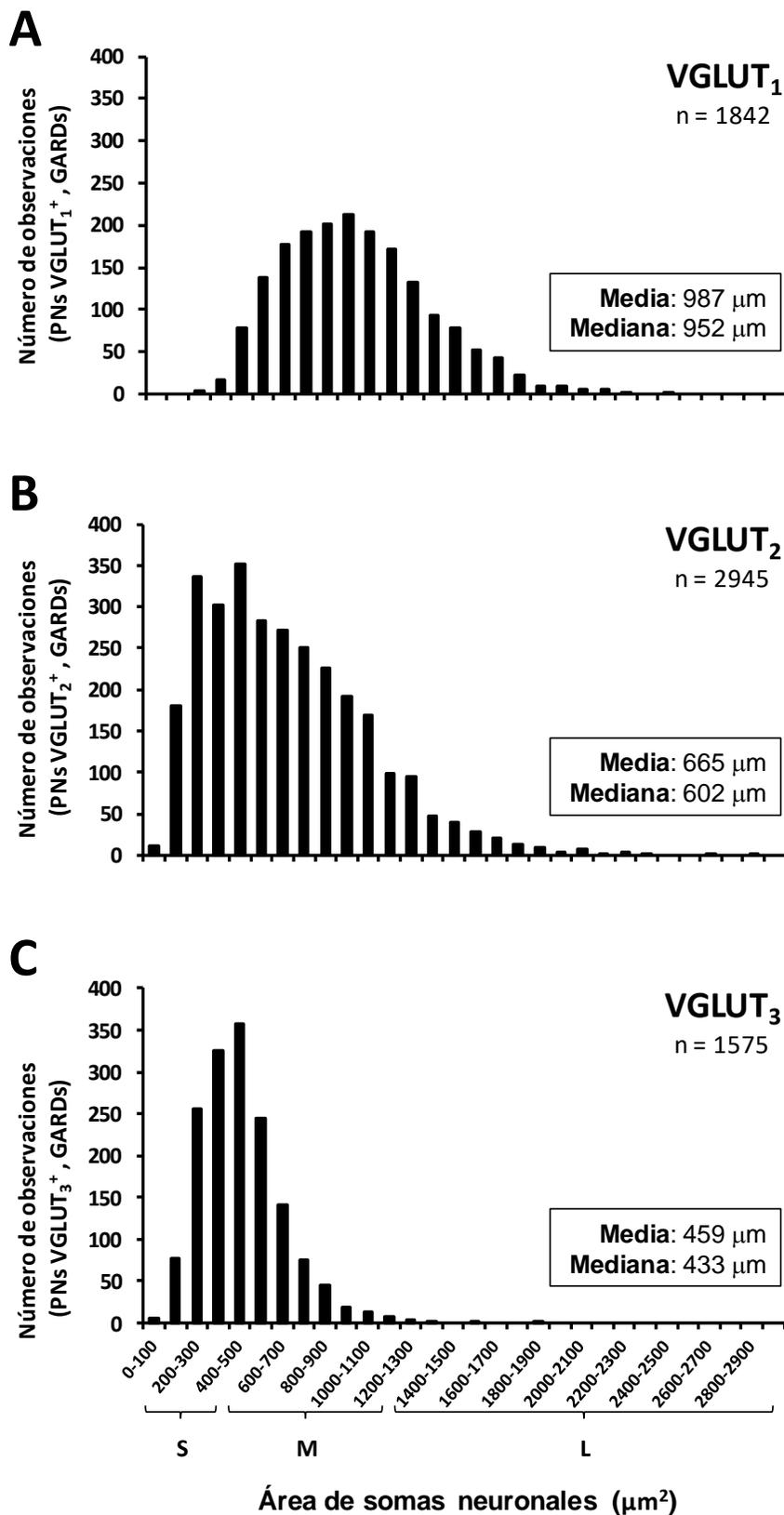


Figura PI.3. Los transcritos de los VGLUTs muestran diferentes patrones de expresión a lo largo de las distintas láminas y niveles de la médula espinal.

Microfotografías de campo oscuro de secciones transversales de la médula espinal de ratones control-Axo de segmentos toracolumbares (A, E, I, D), lumbares (B, F, J, H) y lumbosacros (C, G, K, L) hibridados con ribosondas 'antisentido' (A - C, E - G, I - K) y 'sentido' (D, H, L) contra el VGLUT1 (A - D), VGLUT2 (E - H) o VGLUT3 (I - L). Se detecta una pequeña cantidad de neuronas positivas para el ARNm de VGLUT1 en la región dorsomedial del asta intermediolateral en segmentos toracolumbares, posiblemente correspondiendo al núcleo dorsal de Clarke (cabezas de flecha en A). Se detectaron ocasionalmente algunas neuronas positivas para el ARNm de VGLUT1 en la región medial del asta dorsal profunda en segmentos lumbares (cabezas de flecha en B). No se observaron neuronas en los segmentos lumbosacros (C). (E - G) Se observaron abundantes neuronas positivas para el ARNm de VGLUT2 en las astas dorsales y ventrales y en el área X a lo largo de todos los segmentos medulares analizados, exceptuando la lámina IX, donde virtualmente no se observaron neuronas positivas para el ARNm de VGLUT2 (asteriscos en F). (I - K) Se observaron algunas neuronas positivas para el ARNm de VGLUT₃ débilmente marcadas en la médula espinal, y sólo en las láminas III - IV del asta dorsal de todos los segmentos analizados (cabezas de flecha). (D, H, L) La hibridación con las ribosondas control 'sentido' para cada uno de los VGLUTs no reveló ninguna señal específica para VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3 (D, H, L, respectivamente). TL, toracolumbar; L, lumbar; LS, lumbosacro. Barra de escala = 100 µm (A - L).

Figure PI.3. VGLUTs transcripts exhibit differential expressions across laminae and spinal cord levels.

Dark-field photomicrographs of transverse sections of the spinal cord of sham-Axo mice at thoracolumbar (A, E, I, D), lumbar (B, F, J, H) and lumbosacral (C, G, K, L) segments, hybridized with antisense (A-C, E-G, I-K) and sense (D, H, L) riboprobes against VGLUT1 (A-D), VGLUT2 (E-H), or VGLUT3 (I-L). (A-C) A small number of VGLUT1 mRNA-positive neurons is detected in the dorsomedial aspect of the intermediate dorsal horn at thoracolumbar segments, possibly corresponding to the dorsal nucleus of Clarke (arrowheads in A). Occasional VGLUT1 mRNA-positive neurons are also detected in the medial part of the deep dorsal horn at lumbar segments (arrowheads in B). No neurons are detected at lumbosacral segments (C). (E-G) Abundant VGLUT2 mRNA-positive neurons are observed in the dorsal and ventral horns, and in area X at all analyzed spinal cord segments, with the exception of lamina IX, where virtually no VGLUT2 mRNA-positive neurons are detected (asterisks in F). (I-K) Only few weakly labeled VGLUT3 mRNA-positive neurons were detected in the spinal cord, and only in laminae III-IV of the dorsal horn, at all analyzed segments (arrowheads). (D, H, L) Hybridization with the control 'sense' riboprobe for each VGLUT resulted in no signal for VGLUT1, VGLUT2, or VGLUT3 (D, H, L, respectively). TL, thoracolumbar; L, lumbar; LS, lumbosacral. Scale bar=100 µm (A-L).

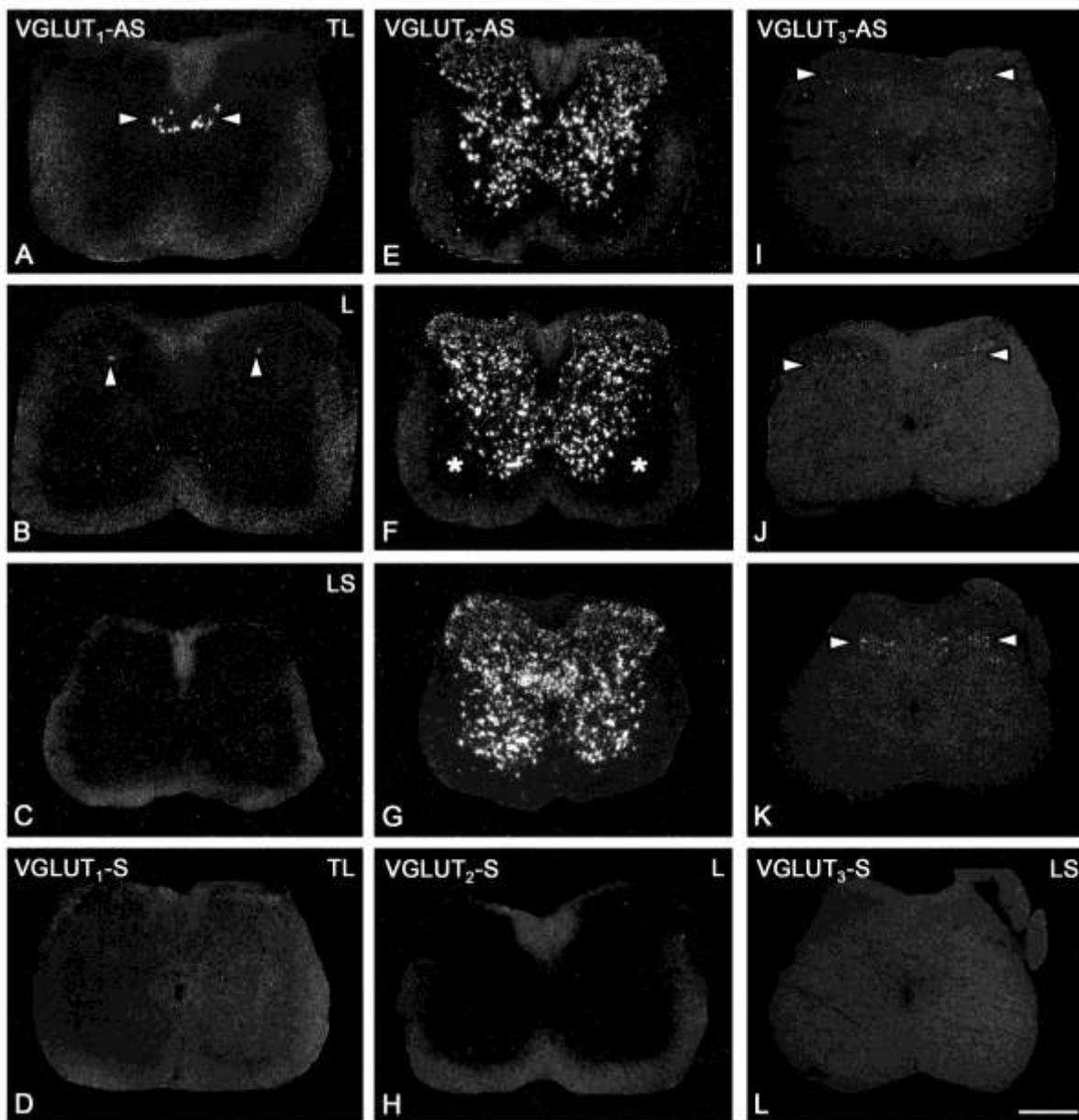


Figura PI.4. El ARNm del VGLUT1 se expresa selectivamente en áreas de la médula espinal que corresponden al núcleo dorsal de Clarke. Microfotografías en campo oscuro (A) y claro (B, C) de una sección del segmento toracolumbar de la médula espinal de ratones control, hibridados con ribosondas 'antisentido' contra VGLUT₁. Las neuronas positivas para el ARNm de VGLUT1 se indican con doble cabeza de flechas en (B) y (C). (A - C) Se observa un pequeño grupo de neuronas positivas para el ARNm del VGLUT1, probablemente en el núcleo dorsal de Clarke (dentro del círculo 1 y doble cabeza de flechas en B). Además, se encontraron neuronas positivas para el ARNm de VGLUT₁ aisladas en la región intermedia de las láminas IV - V de las astas dorsales (dentro del círculo 2 y doble cabeza de flechas en C). TL, toracolumbar. Barra de escala = 100 μ m (A), 50 μ m (C = B).

Figure PI.4. VGLUT1 mRNA is selectively expressed in spinal cord areas corresponding to the dorsal nucleus of Clarke. Dark- (A) and bright-field (B, C) photomicrographs of a section of the thoracolumbar spinal cord of sham mice, hybridized with the 'antisense' riboprobe against VGLUT1. Double arrowheads in (B) and (C) show VGLUT1 mRNA-positive neurons. (A-C) A small group of VGLUT1 mRNA-positive neurons is detected in, probably, the dorsal nucleus of Clarke (encircled area '1' and double arrowheads in B). Additional isolated VGLUT1 mRNA-positive neurons are also found in the intermediate aspects of laminae IV-V of the dorsal horns (encircled area '2' and double arrowheads in C). TL, thoracolumbar. Scale bars=100 μ m (A), 50 μ m (C=B).

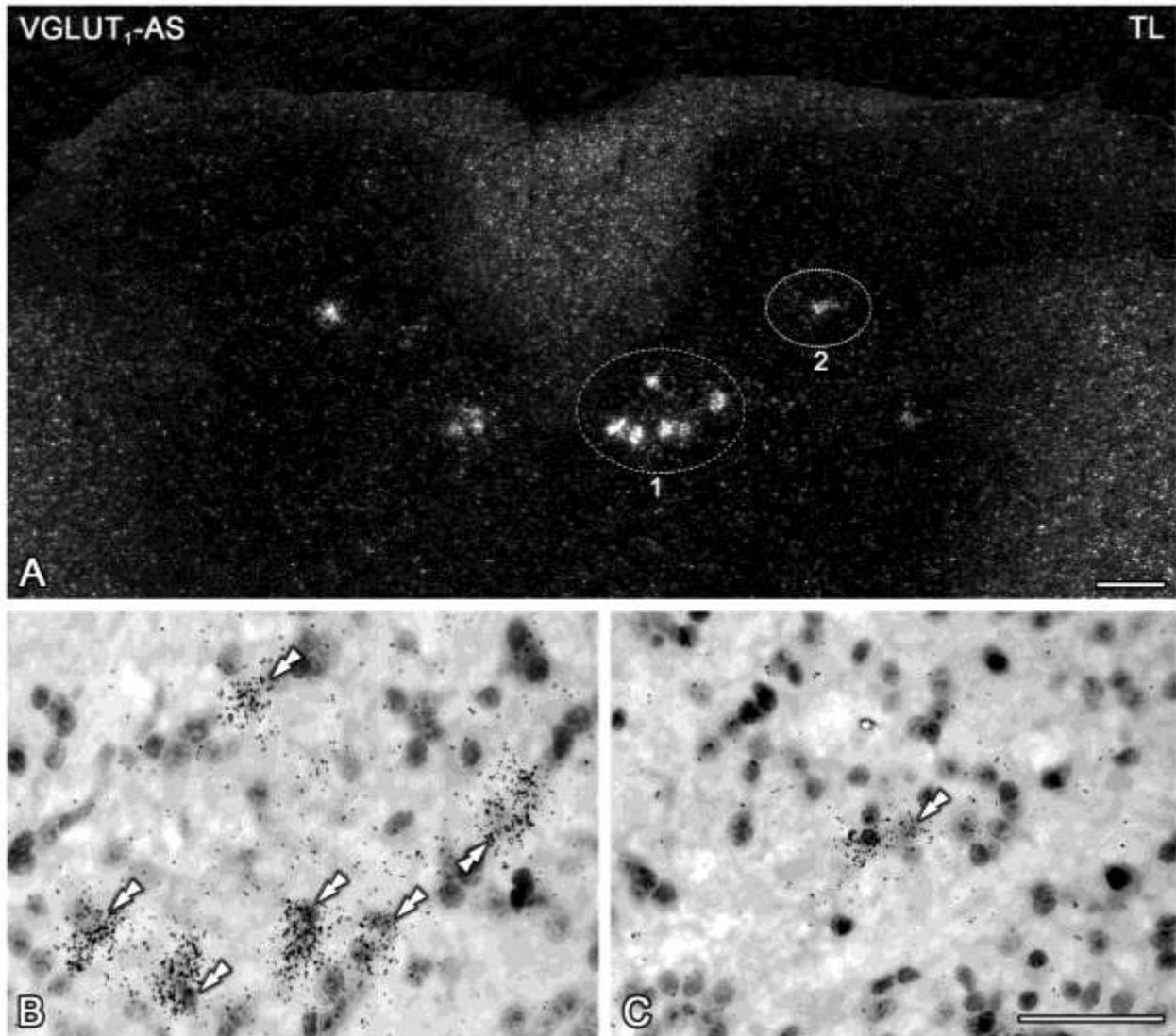


Figura PI.5. La expresión del ARNm para el VGLUT2 en la médula espinal es amplia y parece excluir el área de las motoneuronas a nivel del ensanchamiento lumbar.

Microfotografías de campo oscuro (A) y claro (B – E) de un segmento lumbar de la médula espinal de un ratón control hibridada con una ribosonda ‘antisentido’ contra el VGLUT2. Las doble cabezas de flecha en (B – E) muestran neuronas positivas para el ARNm de VGLUT₂. Las imágenes amplificadas en (B – E) han sido sacadas de áreas indicadas con los números del (1 – 4) en (A), respectivamente. (A – E) Se observan muchas neuronas positivas para el ARNm de VGLUT2 en el asta dorsal superficial (A, B) y profunda (A, C), área X (A, D) y en la región medial del asta ventral (A, E). Nótese la señal difusa del ARNm del VGLUT2 en el asta dorsal superficial, siempre asociada a perfiles neuronales (doble cabezas de flecha en B). Nótese también la ausencia de neuronas positivas para el ARNm de VGLUT2 en la región lateral del asta ventral (E, cabezas de flecha blancas). La línea punteada en (E) representa el límite entre la sustancia gris y blanca. L, lumbar. Barra de escala = 100 μ m (A), 50 μ m (E = B – D).

Figure PI.5. VGLUT2 mRNA expression in the spinal cord is widespread and appears to exclude the area of motoneurons in the lumbar enlargement.

Dark- (A) and bright-field (B–E) photomicrographs of a section of the lumbar spinal cord of sham mice, hybridized with the ‘antisense’ riboprobe against VGLUT2. Double arrowheads in (B–E) show VGLUT2 mRNA-positive neurons. Magnified images shown in (B–E) have been taken from the areas indicated with numbers (1–4) in (A), respectively. (A–E) Many VGLUT2 mRNA-positive neurons are detected in the superficial (A, B) and deep (A, C) dorsal horn, area X (A, D) and the medial aspect of the ventral horn (A, E). Note the diffuse VGLUT2 mRNA signal in the superficial dorsal horn, always associated with somatic profiles (double arrowheads in B). Also note the absence of VGLUT2 mRNA-positive neurons in the lateral aspect of the ventral horn (E, white arrowheads). The dotted line in (E) represents the border between the gray and white matter. L, lumbar. Scale bar=100 μ m (A), 50 μ m (E=B–D).

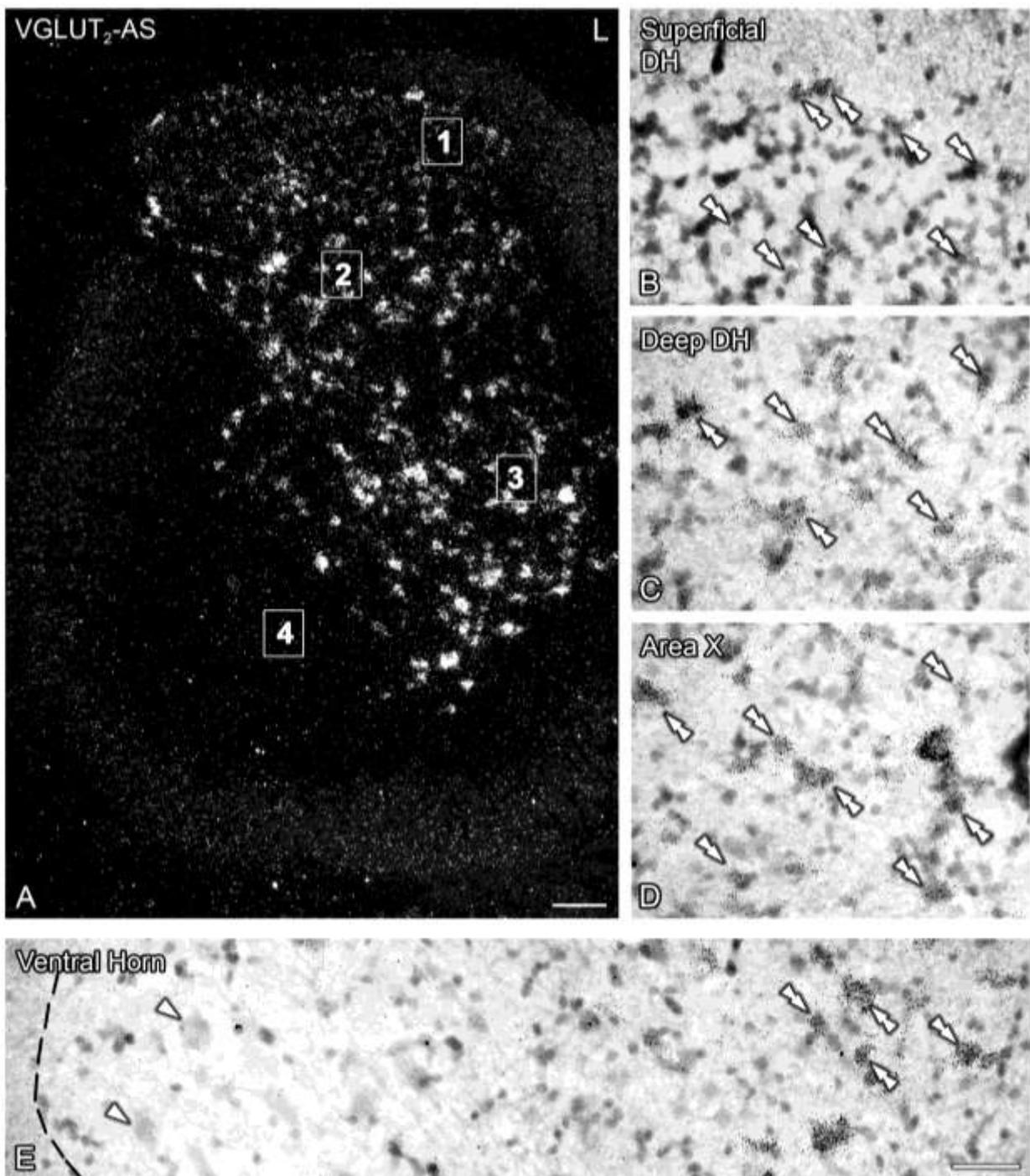


Figura PI.6. El ARNm del VGLUT3 se expresa de manera discreta en algunas neuronas del asta dorsal profunda. Microfotografías de campo oscuro (A) y claro (B) de un segmento lumbosacro de la médula espinal de un ratón control, hibridado con una ribosonda 'antisentido' contra el VGLUT3. Las doble cabezas de flecha en (A, B) marcan neuronas positivas para el ARNm de VGLUT3. (A, B) Se observan pocas neuronas positivas para el ARNm de VGLUT3, y siempre localizadas en las láminas III – V del asta dorsal (recuadro en A; magnificado en B). LS, lumbosacro. Barra de escala = 100 μ m (A), 50 μ m (B).

Figure PI.6. VGLUT3 mRNA is discretely expressed in some neurons in the deep dorsal horn. Dark- (A) and bright-field (B) photomicrographs of a section of the lumbosacral spinal cord of sham mice, hybridized with the 'antisense' riboprobe against VGLUT3. Double arrowheads in (A, B) show VGLUT3 mRNA-positive neurons. (A, B) Only few VGLUT3 mRNA-positive neurons are detected, always localized to laminae III–V of the dorsal horn (box in A; shown at higher magnification in B). LS, lumbosacral. Scale bars=100 μ m (A), 50 μ m (B).

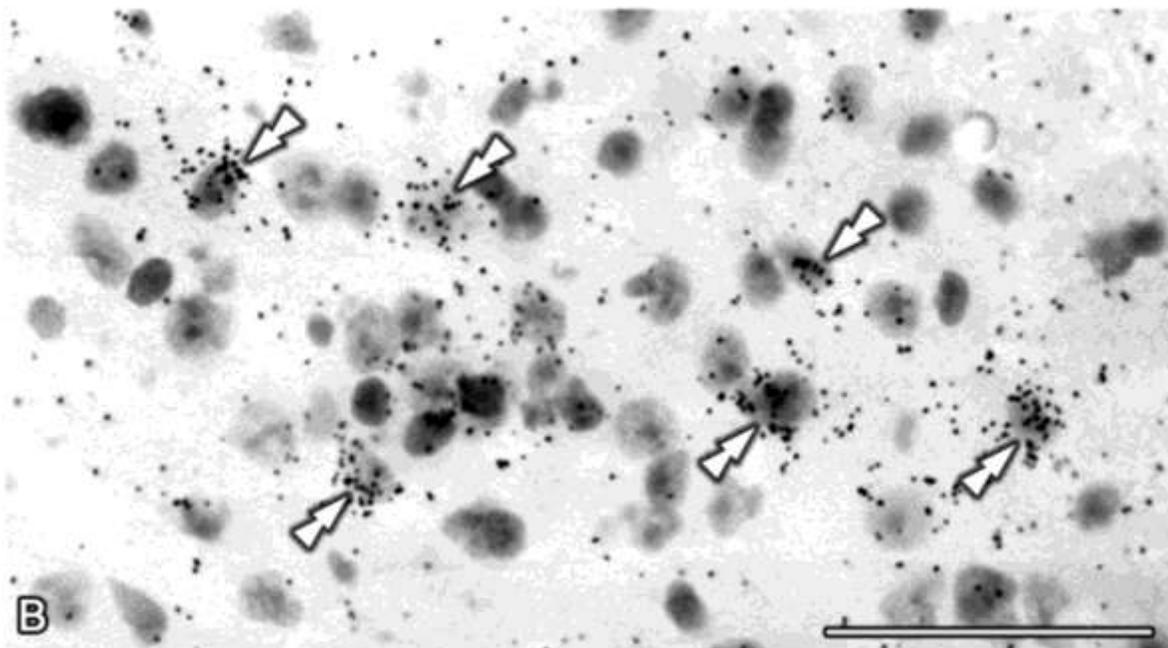
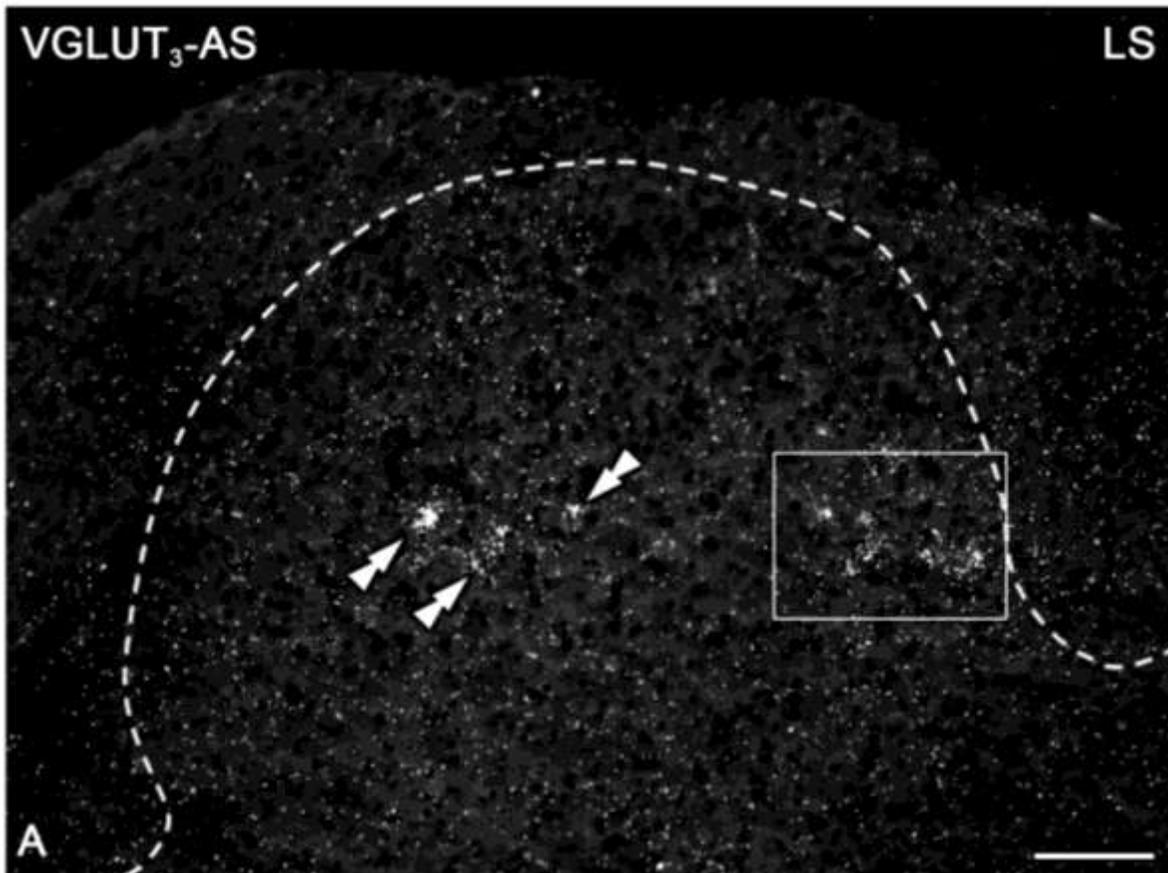
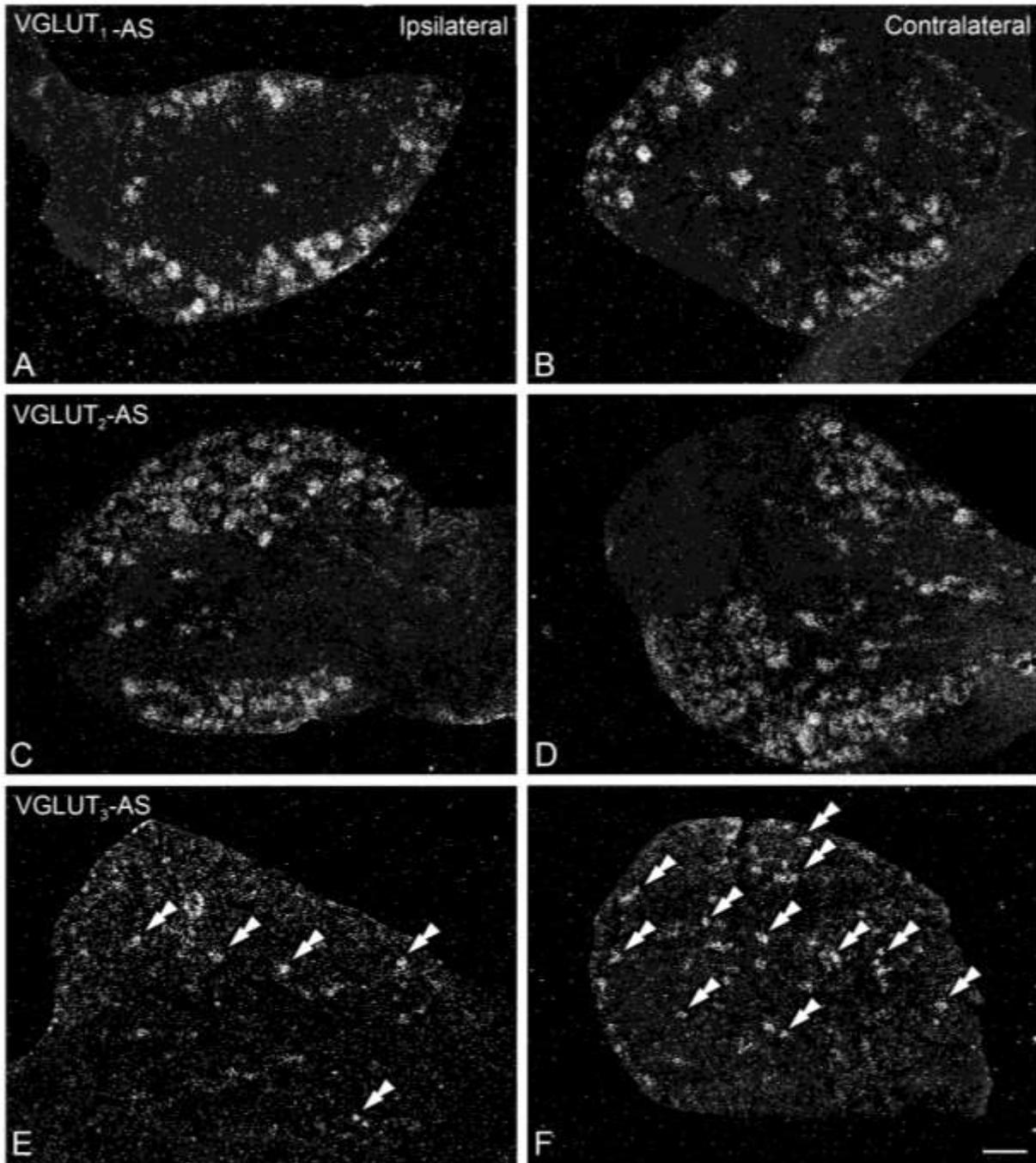


Figura PI.7. La axotomía del nervio ciático induce la disminución de la expresión del ARNm del VGLUT₃ en los GARDs, dejando inalteradas las del VGLUT1 y el VGLUT2. Microfotografías de campo oscuro de secciones ipsilaterales (A, C, E) y contralaterales (B, D, F) de los GARDs de ratones luego de 7 días de una axotomía del nervio ciático, hibridadas con ribosondas 'antisentido' contra el VGLUT1 (A, B), VGLUT2 (C, D) o VGLUT3 (E, F). Las doble cabezas de flechas en (E, F) indican los PNs positivos para el ARNm del VGLUT3. (A - F) Al igual que en el lado contralateral, los PNs positivos para el ARNm del VGLUT1 o el VGLUT2 en el lado ipsilateral de los GARDs no sufren alteración luego de 7 días de axotomía del nervio ciático (A vs. B y C vs. D, respectivamente). De lo contrario, y en comparación con los GARDs del lado contralateral (F), se observa una disminución en el número de PNs positivos para el ARNm del VGLUT3 en los GARDs ipsilaterales (E). Barra de escala = 100 μ m (F = A - E).

Figure PI.7. Axotomy of the sciatic nerve induces down-regulation of VGLUT3 mRNA expression in DRGs, leaving VGLUT1 and VGLUT2 unaffected. Dark-field photomicrographs of sections of ipsilateral (A, C, E) and contralateral (B, D, F) DRG of mice after a 7-day axotomy of the sciatic nerve, hybridized with 'antisense' riboprobes against VGLUT1 (A, B), VGLUT2 (C, D) or VGLUT3 (E, F). Double arrowheads in (E, F) show VGLUT3 mRNA-positive NPs. (A-F) A 7-day axotomy of the sciatic nerve does not alter the number of VGLUT1 or VGLUT2 mRNA-positive NPs in the ipsilateral DRG, as compared to the contralateral ones (A vs. B and C vs. D, respectively). In contrast, a decrease in the number of VGLUT3 mRNA-positive NPs was detected in ipsilateral DRG (E), as compared to the contralateral DRG (F). Scale bar=100 μ m (F=A-E).



Proyecto II. La axotomía de ramos tributarios de los nervios pélvico y pudendo induce cambios en la neuroquímica de neuronas de los ganglios anexos a la raíz dorsal y la médula espinal del ratón

Efectos de la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6–S1 sobre la expresión de ATF3 en los PNs de los GARDs L4–S2

Siempre que se encontrara presente, la inmunomarcación del *factor de transcripción dependiente de AMPc 3 (ATF3)* se observó de manera clara e intensa en el núcleo celular, comúnmente asociado a una tinción citoplasmática más débil (Figura PII.1a – d). Solo se detectó un muy pequeño porcentaje de PNs inmunorreactivos (IR) para el ATF3 en los GARDs L6–S1 contralaterales de los ratones con axotomía o control (Tabla PII.1; Figura PII.1a, c). Por el contrario, la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6–S1 resultó en un dramático aumento del porcentaje de PNs ATF3-IR en los GARDs L6–S1 ipsilaterales y que parecía estar presente en neuronas de todos los tamaños celulares (Tabla PII.1; Figura PII.1b). Los animales control mostraron un aumento significativo, aunque pequeño, en el porcentaje de PNs ATF3-IR en los GARDs L6–S1 (Tabla PII.1; Figura PII.1d). Asimismo, sólo los PNs de pequeño tamaño en los GARDs aparentaron estar afectados en los ratones control (Figura PII.1d). Finalmente, en muchos PNs de los GARDs en donde el ATF3 aumentó su expresión, se pudo observar lateralización nuclear, la cual fue independiente del tamaño del cuerpo celular (Figura PII.1b, d) o del nivel ganglionar estudiados.

El análisis de los GARDs vecinos L4–5 y S2 demostró la presencia de un pequeño porcentaje de PNs ATF3-IR en el lado contralateral de ratones control y axotomizados en L6–S1. Este patrón de expresión no se vió alterado significativamente en el lado ipsilateral (Tabla PII.1).

La presencia de PNs ATF3-IR en los GARDs L4-5 y S2 puede ser debido a la manipulación de los tejidos dentro de la cavidad abdominal durante la inducción de la axotomía o la lesión en animales control, y la lesión accidental de algún axón originado en esos GARDs. Sin embargo, debido a que el porcentaje de PNs ATF3-IR generalmente fue muy bajo en estos niveles ganglionares y no estadísticamente significativo entre los lados contra e ipsilateral (Tabla PII.1), se estudiaron otros cambios neuroquímicos inducidos por la axotomía del L6-S1 sólo en los GARDs L6-S1 (descritos en la siguiente sección).

Efectos de la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 sobre la expresión del CGRP, el TRPV1, la TH y los VGLUT1 y VGLUT2 en los PNs de los GARDs L6-S1

Se detectaron abundantes PNs CGRP-IR de tamaño pequeño, mediano y grande en los GARDs L6-S1 contralaterales de ratones con axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 y en ratones control (Tabla PII.1; Figura PII.1e, g.). Por el contrario, se observó una disminución en el porcentaje de los PNs CGRP-IR en los GARDs ipsilaterales de ratones con axotomía del L6-S1 pero no en ratones control (Tabla PII.1; Figura PII.1f, h.).

Asimismo, se observó un gran número de PNs TRPV1-IR de pequeño y mediano tamaño en los GARDs contralaterales L6-S1 de ratones con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 y en ratones control (Tabla PII.1, Figura PII.2a, c.). Por el contrario, la axotomía de L6-S1 resultó en una disminución significativa en el porcentaje de PNs TRPV1-IR en los GARDs ipsilaterales (Tabla PII.1; Figura PII.2f).

Esto fue diferente de lo observado en ratones control, donde no se evidenciaron cambios en el porcentaje de PNs TRPV1-IR (Tabla PII.1; Figura PII.2h).

Se detectó un número de PNs pequeños y medianos TH-IR en los GARDs contralaterales L6-S1 de los ratones con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 (Tabla PII.1; Figura PII.2e, g), mientras que se destacó una disminución en el porcentaje de PNs TH-IR en los GARDs ipsilaterales L6-S1 de los animales lesionados (Tabla PII.1, Figura PII.2f). El porcentaje de PNs TH-IR no cambió en los GARDs ipsilaterales de ratones control (Tabla PII.1; Figura PII.2h).

Algunos PNs de tamaño grande y mediano mostraron inmunoreactividad para VGLUT1 en los GARDs L6-S1 contralaterales en ratones control y con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 (Tabla PII.1; Figura PII.3a, c). Contrariamente a lo observado para CGRP, TRPV1 y TH, no se detectaron cambios significativos en el porcentaje de PNs VGLUT1-IR en GARDs ipsilaterales tanto en ratones control como con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 (Tabla PII.1; Figura PII.3b, d). Por otro lado, se observó normalmente un gran número de PNs VGLUT2-IR en los GARDs contralaterales L6-S1 en ratones con axotomía y en los ratones control (Tabla PII.1; Figura PII.3e, g, i). Por el contrario, los GARDs ipsilaterales de ratones con axotomía mostraron una disminución en el porcentaje de PNs VGLUT2-IR (Tabla PII.1; Figura PII.3f, h). En paralelo, se observó un aparente aumento de la inmunoreactividad de VGLUT2 en varios PNs de tamaño pequeño en los GARDs lesionados (Figura PII.3f,h). Finalmente, los ratones control no mostraron cambios en el porcentaje o intensidad de la señal de PNs VGLUT2-IR (Tabla PII.1; Figura PII.3j).

El análisis del tamaño de los somas de los PNs VGLUT2-IR mostró una tendencia hacia la reducción de la representación de PNs medianos en los ratones con axotomía (Figura PII.4a, b), tanto durante la comparación de GARDs contra- vs. ipsilaterales de ratones con axotomía, así como de GARDs ipsilaterales entre ratones control vs. axotomizados.

Efectos de la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 sobre la expresión del ATF3 en la médula espinal torácica, lumbar y sacra.

La axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 indujo el aumento en la expresión de ATF3 en un número considerable de motoneuronas ipsilaterales de la médula espinal (Figura PII.5 a-c). El grupo de motoneuronas ATF3-IR se observa tanto en el aspecto lateral como medial del asta ventral ipsilateral en ratones con axotomía para L6-S1 (Figura PII.5 a,b), como también a nivel lumbosacro (Figura PII.5 a,c) y niveles sacros de la médula espinal. Por el contrario, sólo se detectaron pocas neuronas ATF3-IR en el asta ventral contralateral de ratones con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 (datos no mostrados).

La axotomía de L6-S1 también indujo un incremento en la expresión de ATF3 en neuronas ipsilaterales de la columna celular intermediolateral de la médula espinal lumbosacra (Figura PII.5 a,d), pero no en el lado contralateral. La coexistencia de motoneuronas y neuronas de la columna celular intermediolateral inmunoreactivas para ATF3 en la misma sección histológica fue poco frecuente

(Figura PII.5 a,c). Finalmente, un ratón con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 exhibió dos neuronas ATF3-IR en el área X, ipsilateral a la lesión (Figura PII.5e).

En los animales control, las motoneuronas ATF3-IR en el asta ventral ipsilateral estuvieron en el rango de cero (Figura PII.5f) hasta algunas pocas (Figura PII.5g), aunque la magnitud de regulación fue siempre considerablemente menor al compararlos con animales axotomizados en L6-S1 (Figura PII.5 a-c). Por el contrario, ningún animal control mostró neuronas ATF3-IR en la columna celular intermediolateral de la médula espinal lumbosacra en el área X (Figura PII.5f).

Finalmente, se detectaron ocasionales motoneuronas ATF3-IR a lo largo de la médula espinal torácica, toracolumbar y del engrosamiento lumbar, usualmente del lado ipsilateral de ratones control y axotomizados, y muy raramente en el lado contralateral (datos no mostrados).

Efectos de la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 sobre la expresión de CGRP, TRPV1, VGLUT1 y VGLUT2 en la médula espinal lumbosacra.

Se observó una intensa inmunoreactividad para CGRP en el asta dorsal superficial de la médula espinal de ratones control y axotomizados (Figura PII.6 a-d). Sin embargo, en comparación con los ratones control (Figura PII.6 d,h), la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 indujo una modesta disminución ipsilateral en la inmunoreactividad para CGRP, en las láminas I-II del asta dorsal (Figura PII.6 b,f). Esta disminución aparente se debió tanto a la reducción de la densidad de fibras CGRP-IR así como de la intensidad de tal inmunoreactividad (comparar Figura PII.6f con e,g,h). Estudios de análisis de

imagen confirmó una reducción en el área ocupada por las fibras CGRP-IR en el asta dorsal ipsilateral de ratones con axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1, en comparación con el lado contralateral ($26,9 \pm 1,8$ vs. $35,8 \pm 1,4$, respectivamente; $P=0,0085$). No se detectaron diferencias en los animales control ($37,2 \pm 3,4$ vs. $36,5 \pm 2,7$, respectivamente; $P=0,8652$).

También se detectó inmunoreactividad para el TRPV1 en el asta dorsal superficial de la médula espinal en animales control y lesionados (Figura PII.7 a-d). Como sucedió con la inmunoreactividad de CGRP, se observó una modesta disminución de la señal inmunoreactiva de TRPV1 en la superficie del asta dorsal ipsilateral en ratones L6-S1 (Figura PII.7 b-f) en comparación con los animales control (Figura PII.7d,h). La disminución pareció deberse a una reducción en la densidad de las fibras TRPV1-IR, particularmente en la lamina II (comparar Figura PII.7f con e,g,h). Estudios de análisis de imagen confirman la reducción en el área ocupada por las fibras TRPV1-IR en el asta dorsal ipsilateral de ratones PNA, en comparación con el lado contralateral ($25,6 \pm 1,6$ vs. $34,2 \pm 2,1$, respectivamente; $P=0,0196$). No se detectaron diferencias en animales control ($34,7 \pm 1,7$ vs. $36,4 \pm 2,2$, respectivamente; $P=0,5724$).

Finalmente, se observó una inmunoreactividad variable de VGLUT1 (con mayor densidad en la lamina I, III-VII del asta dorsal, menos densa en las astas ventrales e inexistente en la lamina II; Figura PII.8 a,c) y una inmunoreactividad muy extendida de VGLUT2 (virtualmente presente en toda la sustancia gris; Figura PII.8b,d), tanto en los ratones control como lesionados. Sin embargo, no se observaron cambios en la densidad de los botones o intensidad de

inmunoreactividad para VGLUT1 o VGLUT2 en los ratones con axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 o en los ratones control (Figura PII.8 a,b).

Figura PII.1. Visualización inmunohistoquímica del ATF3 y el CGRP en neuronas de los GARDs L6 y S1 de ratones axotomizados y control. Fotografías de campo claro de secciones de los GARDs contralaterales (a, c, e, g) e ipsilaterales (b, d, f, h) S1 (a, b) y L6 (c – h) axotomizados (a, b, e, f) o controles (c, d, g, h), luego de incubaciones con ATF3 (a – d) o el CGRP (e – h) (Las cabezas de flecha muestran los PNs inmunorreactivos). Se observan pocos PNs inmunorreactivos para el ATF3 de los GARDs L6 o S1 de animales axotomizados (a) y control (c). De lo contrario, se observa un aumento dramático en el número de PNs inmunorreactivos para el ATF3 en los GARDs L6 y S1 ipsilaterales de ratones axotomizados en neuronas de diferentes tamaños (b). Nótese la lateralización de varios de los PNs inmunorreactivos para el ATF3. Los animales control muestran un aumento mucho menor en el número de PNs inmunorreactivos para el ATF3. La mayoría de los PNs son de tamaño pequeño (d). (e – h) Se detectan muchos PNs inmunorreactivos para el CGRP de diferentes tamaños y un neurópilo inmunorreactivo para el CGRP en los GARDs L6 contralaterales de ratones axotomizados (e) o controles (g). De lo contrario, los animales axotomizados inducen una disminución considerable del número de PNs inmunorreactivos para el CGRP en los GARDs L6 y S1 y sólo un pequeño número de PNs de tamaño pequeño, mediano y grande permanecen expresando el péptido (f). El número de las fibras nerviosas y PNs inmunorreactivos para el CGRP permanece inalterado en animales control (h). Barra de escala =50 μ m (h = a – g).

Figure PII.1. Immunohistochemical visualization of ATF3 and CGRP in L6 and S1 DRG neurons of L6–S1-AXO and sham mice. Bright-field photomicrographs of sections of contralateral (a, c, e, g) and ipsilateral (b, d, f, h) S1 (a, b) and L6 (c–h) DRGs of L6– S1-AXO (a, b, e, f) or sham (c, d, g, h) mice, after incubation with ATF3 (a–d) or CGRP (e– h) antisera. (Arrowheads show ATF3- (a–d) or CGRP- (e–h) IR NPs). (a–d) Only rare ATF3-IR NPs are observed in contralateral S1 or L6 DRGs from L6–S1-AXO (a) or sham (c) mice. In contrast, a dramatic upregulation in the number of ATF3-IR NPs is observed in the ipsilateral DRGs of L6–S1- AXO mice, encompassing various cell body sizes (b). Note the lateralization of the nucleus of several of the ATF3-IR NPs. Sham mice show a much smaller increase in the number of ATF3-IR NPs, mostly of small size (d). (e–h) Many CGRP-IR NPs of different sizes and a noticeable CGRP-IR neuropil are detected in contralateral L6 DRGs from L6–S1-AXO (e) or sham (g) mice. In contrast, L6–S1- AXO induces a considerable downregulation of the number of CGRP-IR NPs in the DRG of L6–S1-AXO mice, and only a few small, medium-sized and large NPs expressing the peptide remain (f). In sham mice, the number of CGRP-IR NPs and the presence of CGRP-IR nerve fibers remain unaltered (h). Scale bar 50 μ m (h = a–g)

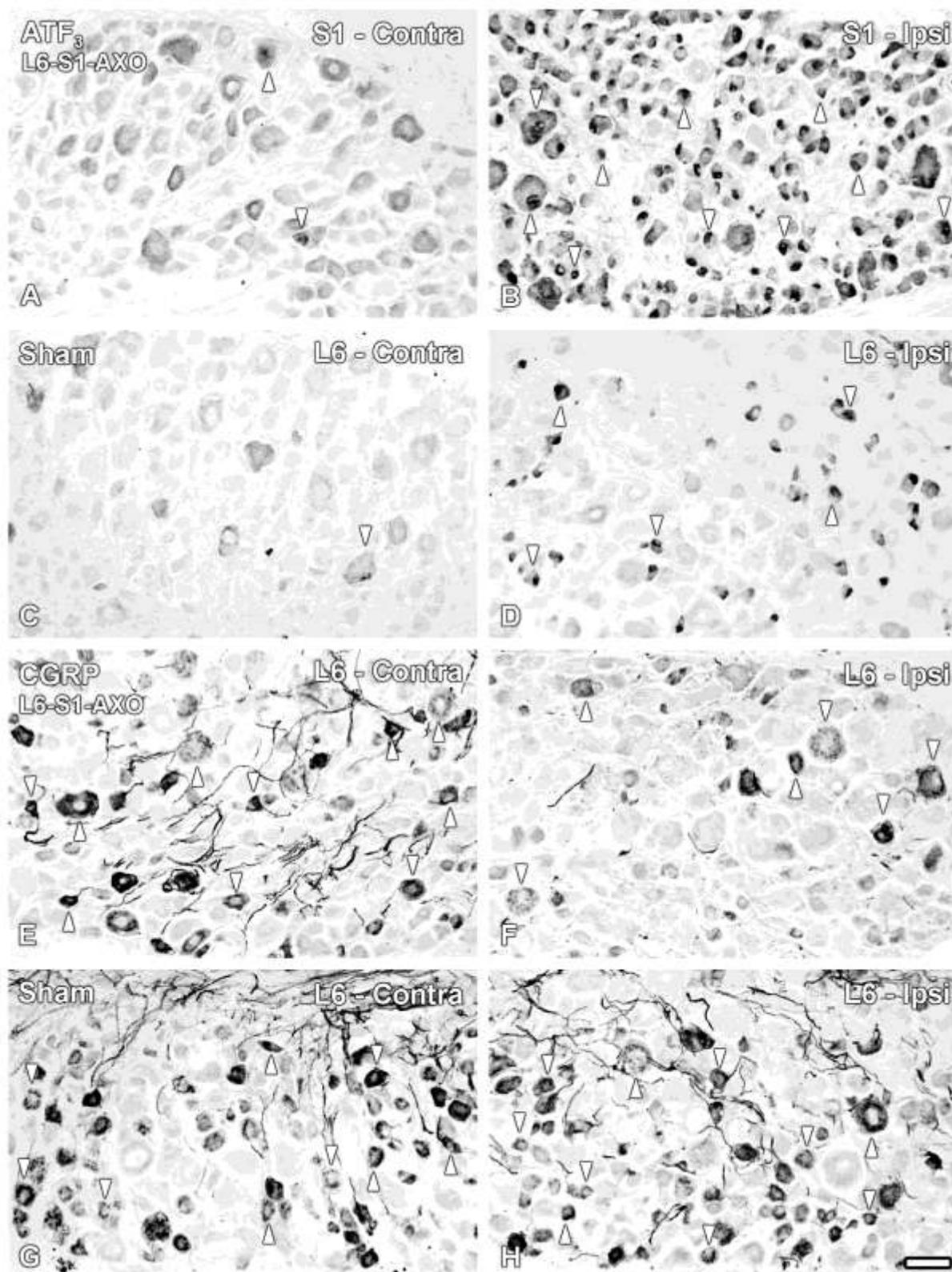


Tabla PII.1. Efectos de la axotomía de L6 – S1 en la expresión del ATF3, CGRP, TRPV1, TH, VGLUT1 y el VGLUT2 en los GARDs L6 – S1, L4 – 5 y S2 del ratón y su comparación con ratones control. Se muestran mediante asteriscos, las diferencias estadísticas significativas entre los lados contralateral (contra) e ipsilateral (ipsi) en los diferentes grupos.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

Table PII.1. Effects of L6–S1-AXO on the expression of ATF3, CGRP, TRPV1, TH, VGLUT1 and VGLUT2 in L6– S1, L4–5 and S2 mouse DRGs and comparison with sham treated mice. Statistically significant differences are shown between contralateral (Contra) and ipsilateral (Ipsi) sides within each group by means of asterisks.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

	Axotomía L6 – S1		Control			
	Contra		Ipsi	Contra		Ipsi
L6 – S1						
ATF3	0.7 ± 0.3	(n = 7)	79.9 ± 1.1***	0.5 ± 0.2	(n = 6)	3.5 ± 0.8**
L4 – 5						
ATF3	0.1 ± 0.1	(n = 7)	2.0 ± 0.6	1.7 ± 1.1	(n = 6)	3.8 ± 2.6
S2						
ATF3	0.1 ± 0.1	(n = 7)	0.3 ± 0.2	1.3 ± 1.3	(n = 6)	0.2 ± 0.2
L6 – S1						
CGRP	26.1 ± 0.9	(n = 7)	12.9 ± 1.2***	26.0 ± 2.0	(n = 6)	24.7 ± 1.5
TRPV1	21.9 ± 1.5	(n = 7)	9.4 ± 1.0***	21.2 ± 1.0	(n = 5)	22.4 ± 0.7
TH	13.8 ± 1.1	(n = 6)	7.0 ± 1.4**	11.8 ± 1.4	(n = 5)	11.2 ± 1.7
VGLUT1	12.2 ± 2.8	(n = 5)	10.4 ± 2.6	10.8 ± 2.0	(n = 5)	11.4 ± 2.0
VGLUT2	56.2 ± 2.5	(n = 6)	48.0 ± 2.0*	53.0 ± 3.2	(n = 5)	53.6 ± 2.8

Figura PII.2. Visualización inmunohistoquímica del TRPV1 y la TH en neuronas de los GARDs L6 – S1 de ratones axotomizados y control. Microfotografías en campo claro de secciones contalaterales (a, c, e, g) e ipsilaterales (b, d, f, h) de los GARDs S1 (a – d, g, h) y L6 (e, f) de ratones con axotomía de L6 – S1 (a, b, e, f) o control (c, d, g, h), luego de la incubación con el antisero del TRPV1 (a – d) o la TH (e – h). (Las cabezas de flecha marcan los PNs IR del TRPV1 – (a – d) o la TH- (e – h)). (a – d) Se observan varios PNs de tamaño pequeño y mediano, IR para el TRPV1 en los GARDs S1 contralaterales de ratones con axotomía de L6 – S1 (a) o control (c). También se observan en estos ganglios varias fibras nerviosas TRPV1 IR (a). De lo contrario, se observa una disminución pronunciada en el número de PNs TRPV1-IR en los GARDs ipsilaterales de los ratones con axotomía de L6 – S1, y sólo se observan pequeñas cantidades de PNs-IR (b). En ratones control, los PNs TRPV1-IR y la presencia de fibras nerviosas TRPV1-IR no presentan cambios aparentes (d). (e – h) Se observa un número de PNs TH-IR de tamaño pequeño y mediano en los GARDs L6 y S1 contralaterales de ratones axotomizados (e) o control (g), respectivamente. La axotomía de L6 – S1 también pareciera reducir el número de fibras nerviosas TH-IR (f). En los animales control, pareciera no haber alteraciones tanto en el número de PNs TH-IR como en la presencia de fibras nerviosas TH-IR (h). Barra de escala = 50 μ m (h = a–g).

Figure PII.2. Immunohistochemical visualization of TRPV1 and TH in L6 and S1 DRG neurons of L6–S1-AXO and sham mice. Bright-field photomicrographs of sections of contralateral (a, c, e, g) and ipsilateral (b, d, f, h) S1 (a–d, g, h) and L6 (e, f) DRGs of L6–S1-AXO (a, b, e, f) or sham (c, d, g, h) mice, after incubation with TRPV1 (a–d) or TH (e–h) antisera. (Arrowheads show TRPV1- (a–d) or TH- (e–h) IR NPs). (a–d) Several small and medium sized TRPV1-IR NPs are observed in contralateral S1 DRGs from L6–S1-AXO (a) or sham (c) mice. Several TRPV1-IR nerve fibers within these ganglia are also apparent (a). In contrast, a pronounced decrease in the number of TRPV1-IR NPs is observed in the ipsilateral DRGs of L6–S1-AXO mice, and only a few immunoreactive NPs remain (b). The number of TRPV1-IR NPs and the presence of TRPV1-IR nerve fibers in sham mice DRGs show no apparent change (d). (e–h) A number of small and medium-sized TH-IR NPs are detected in contralateral L6 and S1 DRGs from L6–S1-AXO (e) or sham (g) mice, respectively. L6–S1-AXO results in the downregulation of the number of TH-IR NPs (f). L6–S1-AXO also seems to reduce the number of TH-IR nerve fibers (f). In sham mice, neither the number of TH-IR NPs nor the presence of TH-IR nerve fibers appears to be altered (h). Scale bar 50 μ m (h = a–g).

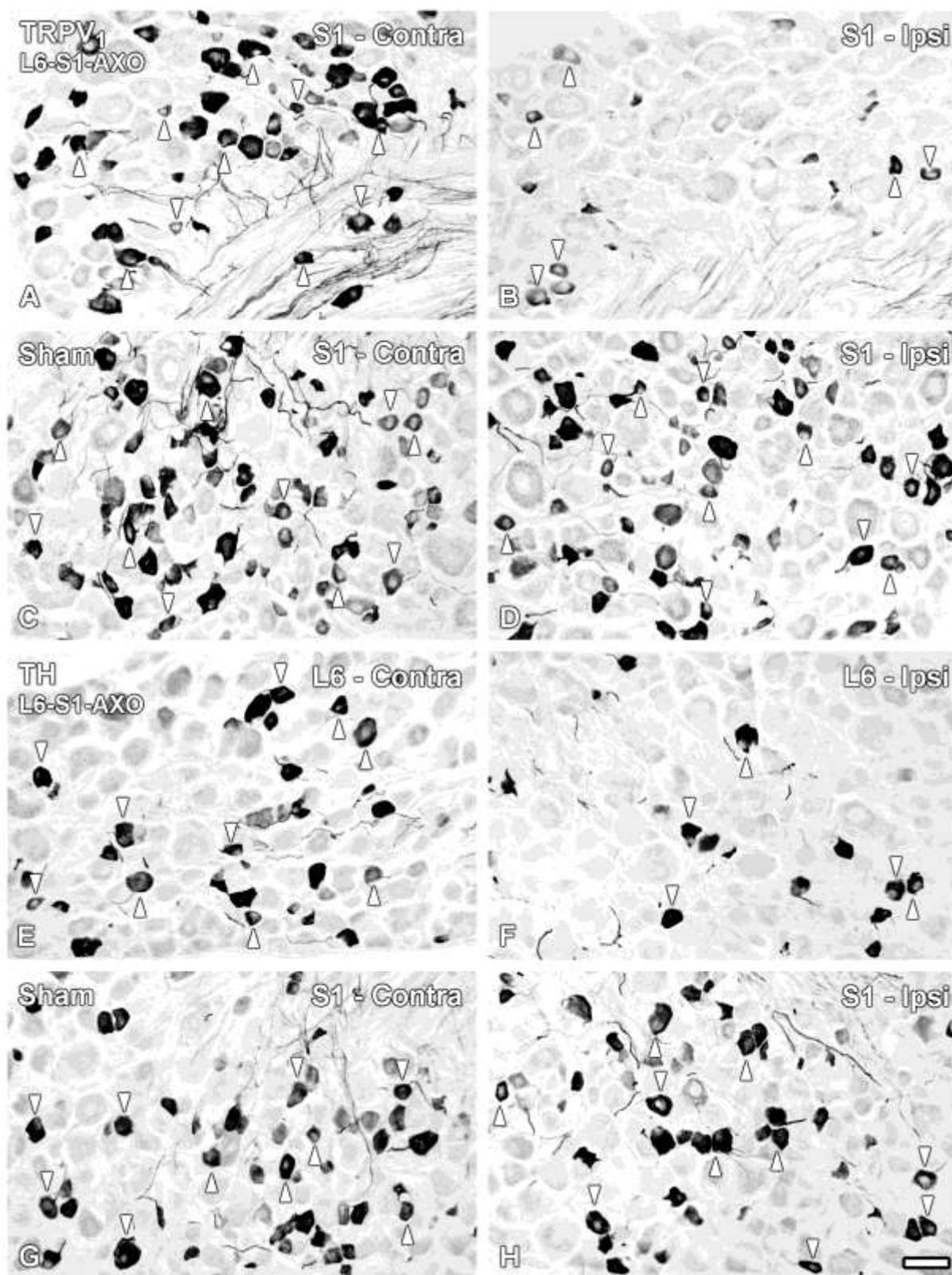


Figura PII.3. Visualización inmunohistoquímica del VGLUT1 y VGLUT2 en neuronas de los GARDs L6 y S1 de ratones con axotomía de L6 – S1 y control. Microfotografías en campo claro de secciones contralaterales (a, c, e, g, i) e ipsilaterales (b, d, f, h, j) de los GARDs L6 (a–d) y S1 (e–j) de ratones con axotomía de L6 – S1 (a, b, e–h) o control (c, d, i, j), luego de incubarlos con un antisuero del VGLUT1 (a–d) o el VGLUT2 (e–j). (Las cabezas de flecha marcan los PNs VGLUT1-(a–d) o VGLUT2-IRs (e–j). Las doble cabeza de flecha marcan los PNs intensamente VGLUT2-IR). (g, h) Magnificaciones de los recuadros en e y f, respectivamente). a – d Se observan un número de PNs de tamaño mediano y grande VGLUT1-IR en los GARDs contralaterales de ratones con axotomía de L6 – S1 (a) y control (c). El número de los PNs VGLUT1-IR permanece inalterado en los GARDs ipsilaterales en ratones con axotomía de L6 – S1 (b) y control (d). (e – j) Se observan abundantes PNs VGLUT2-IR de todos los tamaños en los GARDs S1 contralaterales de ratones con axotomía de L6 – S1 (e,g) y control (i). La axotomía de L6 – S1 induce una modesta disminución del número de PNs VGLUT2-IR (f, h). Se observa que permanecen algunos PNs de tamaño pequeño y mediano en los GARDs, mientras que también se observan otros PNs pequeños que aparentemente muestran una inmunorreactividad del VGLUT2 más intensa, normalmente oscureciendo la observación del núcleo (f, h). En los ratones control, no se observan variaciones en el número o en la apariencia de los PNs VGLUT2-IR (j). Barra de escala = 100 μ m (h = g), 50 μ m (j = a–f, i, j).

Figure PII.3. Immunohistochemical visualization of VGLUT1 and VGLUT2 in L6 and S1 DRG neurons of L6–S1-AXO and sham mice. Bright-field photomicrographs of sections of contralateral (a, c, e, g, i) and ipsilateral (b, d, f, h, j) L6 (a–d) and S1 (e–j) DRGs of L6–S1-AXO (a, b, e–h) or sham (c, d, i, j) mice, after incubation with VGLUT1 (a–d) or VGLUT2 (e–j) antisera. (Arrowheads show VGLUT1-(a–d) or VGLUT2-IR (e–j) NPs). Double arrowheads show intensely VGLUT2-IR NPs. (g, h) High power magnifications of the boxes in e and f, respectively). a–d A number of medium-sized and large VGLUT1-IR NPs are observed in contralateral L6 DRGs from L6–S1-AXO (a) or sham (c) mice. The number of VGLUT1-IR NPs remains unaltered in ipsilateral DRGs of L6–S1-AXO (b) or sham (d) mice. (e–j) Abundant VGLUT2-IR NPs of all sizes are observed in contralateral S1 DRGs from L6–S1-AXO (e, g) or sham (i) mice. L6–S1-AXO induces a modest downregulation of the number of VGLUT2-IR NPs (f, h). Some small and medium-sized DRG NPs remain, while several other small NPs apparently exhibiting a stronger VGLUT2-LI, normally obscuring the observation of the nucleus, are also observed (f, h). In sham mice, neither the number nor the appearance of VGLUT2-IR NPs varied noticeably (j). Scale bars 100 μ m (h = g), 50 μ m (j = a–f, i, j).

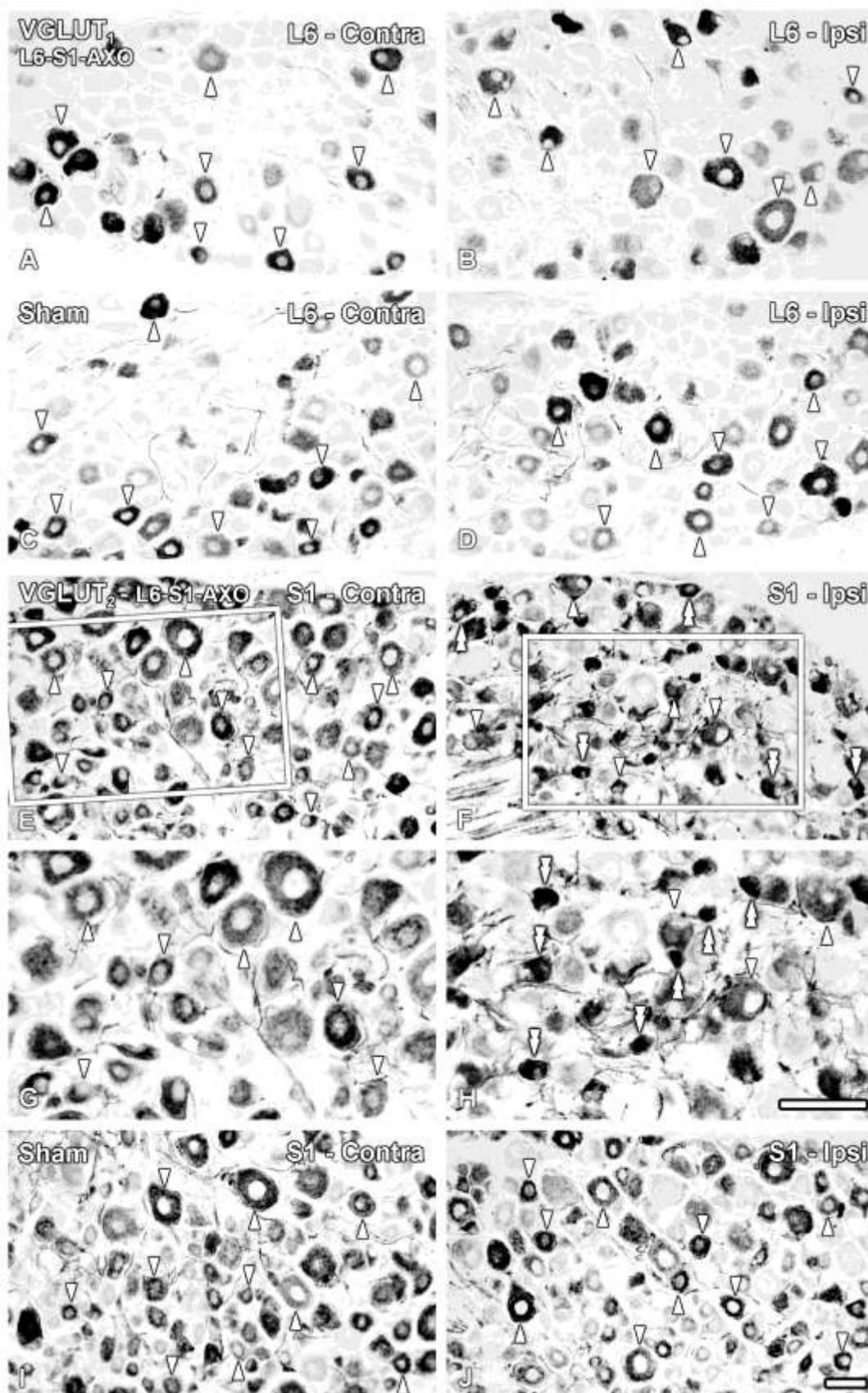


Figura PII.4. Distribución de los tamaños de los cuerpos celulares de los PNs VGLUT2-IR de los GARDs L6 – S1 de ratones con axotomía de L6 –S1 y control. (a) Histograma que muestra la distribución de los PNs VGLUT2-IR, parcelados en segmentos de $200\text{-}\mu\text{m}^2$. (b) Los datos en (a) se encuentran agrupados según la distribución normal de los PNs de los GARDs del ratón en tamaño pequeño ($0\text{-}400\ \mu\text{m}^2$), mediano ($400\text{-}1225\ \mu\text{m}^2$) o grande (1225-más) (las flechas marcan la tendencia de la disminución del número de PNs VGLUT2-IR de tamaño mediano).

Figure PII.4. Cell body size distribution of VGLUT2-IR NPs in L6–S1 DRGs of L6–S1-AXO and sham mice. (a) Histogram shows VGLUT2-IR NPs size distribution, parceled into $200\text{-}\mu\text{m}^2$ bins. (b) Data in (a) are grouped based on the regular distribution of mouse DRG NPs in small ($0\text{-}400\ \mu\text{m}^2$), medium sized ($400\text{-}1225\ \mu\text{m}^2$) or large (1225-more) categories (arrows show the tendency of decrease in the numbers of medium-sized VGLUT2-IR NPs).

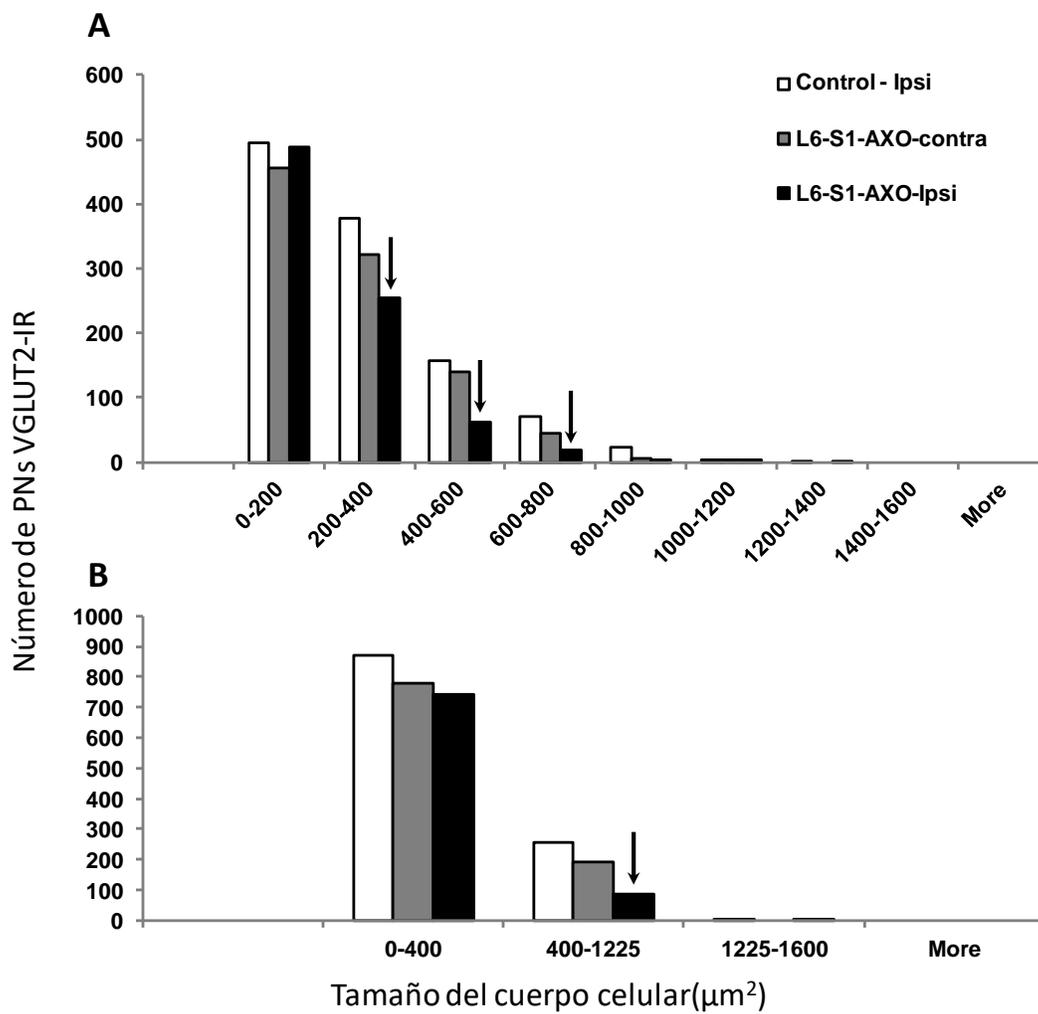


Figura PII.5. Visualización inmunohistoquímica del ATF3 en la médula espinal LS o S de ratones con axotomía de L6 – S1 o control. Microfotografías de campo claro de secciones transversales de la médula espinal del ratón LS (a, c-f) o S (b, g) luego de la incubación con antisuero del ATF3 (c es un aumento del recuadro en a). (a-d) La axotomía de L6 – S1 produce un aumento del ATF3 en motoneuronas (flechas negras y blancas en a – c) y en neuronas más pequeñas en la columna celular intermediolateral (cabeza de flecha en a, d). (c, d) Una magnificación resalta la presencia de neuronas ATF-IR en las áreas medial (flechas negras) y lateral (flechas blancas) de las astas ventrales, así como también en neuronas de la columna celular intermediolateral (cabeza de flecha). También se indican en (d)(cabeza de flecha) neuronas más abundantes en esta localización. (e-g) Raramente, se detectan neuronas ATF3-IR en el área X (doble cabeza de flecha) hacia el lado ipsilateral de la médula espinal en ratones con axotomía de L6 – S1. Nunca se detectó la expresión del ATF3 en neuronas de la columna celular intermediolateral de la médula espinal de ratones control (f) y sólo se vió limitada a unas pocas motoneuronas de las áreas mediales de las astas ventrales (flechas negras en g). Barra de escala = 100 μ m.

Figure PII.5. Immunohistochemical visualization of ATF3 in the LS or S spinal cord of L6–S1-AXO and sham mice. Bright-field photomicrographs of transverse sections of the mouse LS (a, c–f) or S (b, g) spinal cord after incubation with ATF3 antiserum (c is a high power magnification of the box in a). a–d L6–S1-AXO results in upregulation of ATF3 in motoneurons (black and White arrows in a–c) and smaller neurons in the intermediolateral cell column (arrowheads in a, d). c, d A high power magnification of a highlights the presence of ATF3-IR neurons in the medial (black arrows) and lateral (white arrows) aspects of the ventral horn, as well as in neurons in the intermediolateral cell column (arrowheads). More abundant neurons in this location are also shown in d (arrowheads). (e–g) Very rarely, ATF3-IR neurons are detected in area X (double arrowheads) towards the ipsilateral side of the spinal cord in an L6–S1-AXO mouse. Expression of ATF3 in the spinal cord of sham mice was never detected in neurons in the intermediolateral cell column (f) and was limited to a few motoneurons in the medial aspects of the ventral horn (black arrow in g). Scale bars =100 μ m.

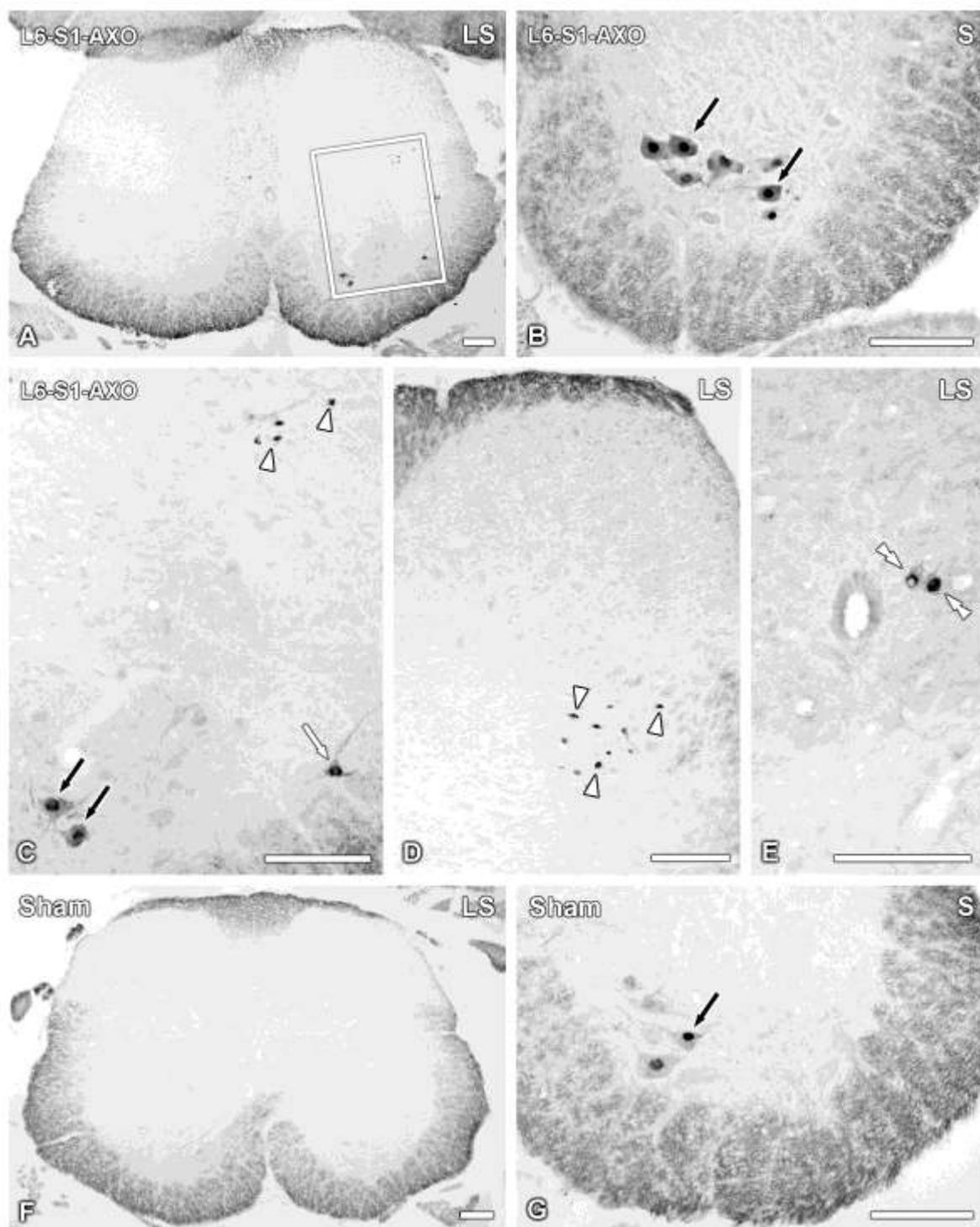


Figura PII.6. Visualización inmunohistoquímica del CGRP en el asta dorsal LS de la médula espinal de ratones con axotomía de L6 – S1 y control. Microfotografías de campo claro de secciones transversales del asta dorsal LS de la médula espinal de ratones con axotomía de L6 – S1 (a, b, e, f) o control (c, d, g, h) luego de la incubación con el antisero del CGRP (e – h son magnificaciones de los recuadros en a – d respectivamente). (a–h) Se observa una intensa inmunorreactividad del CGRP en el asta dorsal superficial contralateral de ratones con axotomía de L6 – S1 y control (a, c, e, g). La axotomía de L6 – S1 induce una modesta disminución en la densidad y la intensidad de la inmunorreactividad del CGRP en las fibras y botones nerviosos en el asta dorsal superficial (b, f). Al contrario, los ratones control no muestran cambios notables en la inmunorreactividad del CGRP en el asta dorsal. Barra de escala = 100 μm (d = a–c); 10 μm (h = e–g).

Figure PII.6. Immunohistochemical visualization of CGRP in the LS dorsal horn of the spinal cord of L6–S1-AXO and sham mice. Bright-field photomicrographs of transverse sections of the mouse LS dorsal horn of the spinal cord of L6–S1-AXO (a, b, e, f) or sham (c, d, g, h) mice after incubation with CGRP antiserum (e–h are high power magnifications of the boxes in a–d, respectively). (a–h) Dense CGRP-LI is detected in the contralateral superficial dorsal horn of L6–S1-AXO and sham mice (a, c, e, g). L6–S1-AXO induces a modest decrease in the density and staining intensity of CGRP-IR nerve fibers and boutons in the superficial dorsal horn (b, f). In contrast, sham mice do not show a noticeable change in CGRP-LI in the dorsal horn. Scale bars 100 μm (d = a–c); 10 μm (h = e–g).

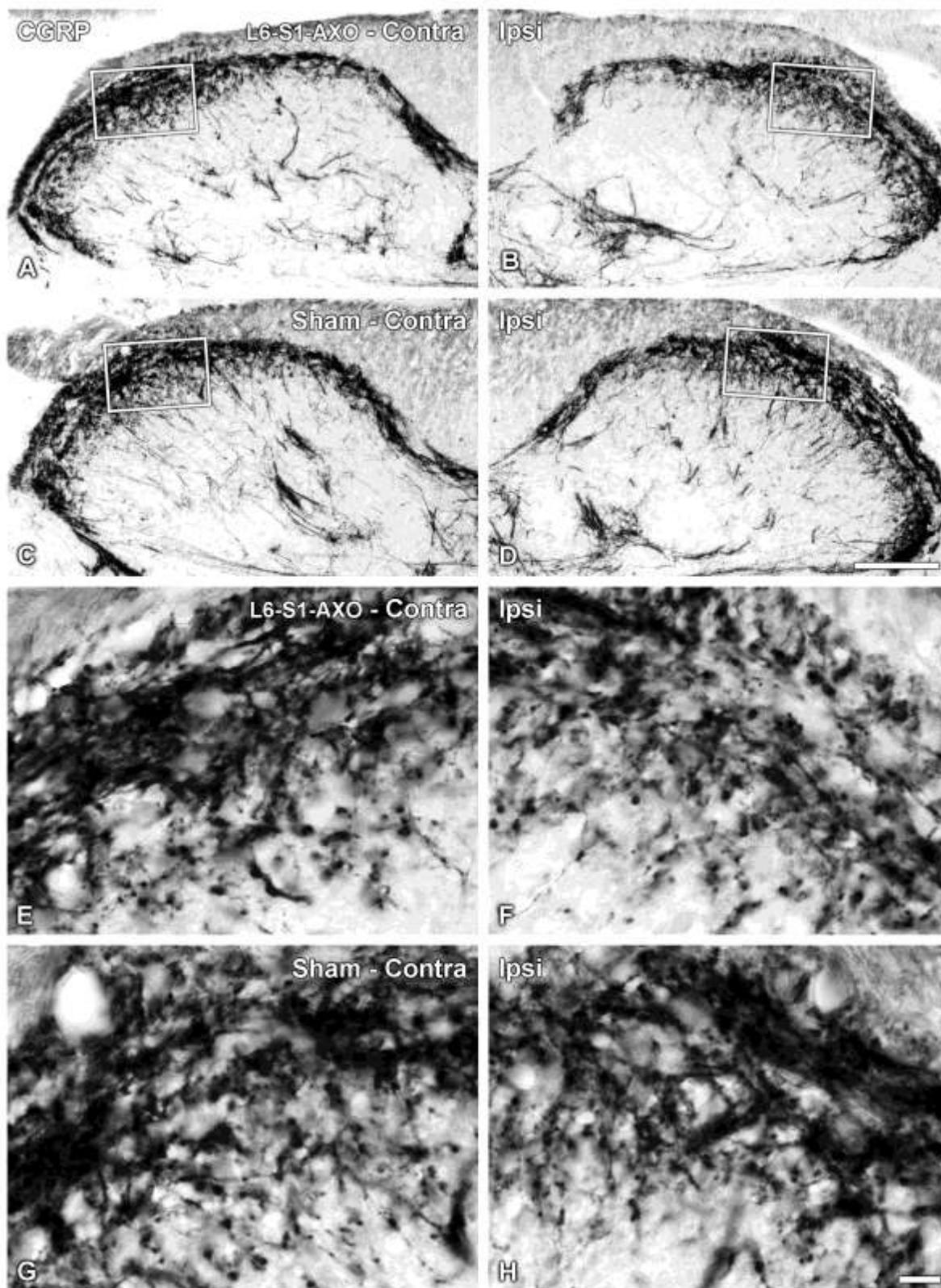


Figura PII.7. Visualización inmunohistoquímica del TRPV1 en el asta dorsal LS de la médula espinal de ratones con axotomía de L6 – S1 y control. Microfotografías de campo claro de secciones transversales de la médula espinal del asta dorsal LS de la médula espinal de ratones con axotomía de L6 – S1 (a, b, e, f) o control (c, d, g, h) luego de la incubación con el antisuero del TRPV1 (e–h son magnificaciones de los recuadros en a – d, respectivamente). (a–h) Se detecta inmunorreactividad del TRPV1 en las astas dorsales superficiales contralaterales de ratones con axotomía de L6 – S1 y control (a, c, e, g). La axotomía de L6 – S1 induce una disminución en la densidad de la inmunorreactividad del TRPV1 en las fibras y botones nerviosos en el asta dorsal superficial, especialmente en la lámina II (b, f). De lo contrario, los ratones control no muestran cambios notables en la inmunorreactividad del TRPV1 en el asta dorsal. Barra de escala = 100 μm (d = a–c); 10 μm (h = e–g).

Figure PII.7. Immunohistochemical visualization of TRPV1 in the LS dorsal horn of the spinal cord of L6–S1-AXO and sham mice. Bright-field photomicrographs of transverse sections of the mouse LS dorsal horn of the spinal cord of L6–S1-AXO (a, b, e, f) or sham (c, d, g, h) mice after incubation with TRPV1 antiserum (e–h are high power magnifications of the boxes in a–d, respectively). a–h TRPV1-LI is detected in the contralateral superficial dorsal horn of L6–S1-AXO and sham mice (a, c, e, g). L6–S1-AXO induces a decrease in the density of TRPV1-IR nerve fibers and boutons in the superficial dorsal horn, especially in lamina II (b, f). In contrast, sham mice do not show a noticeable change in TRPV1- LI in the dorsal horn. Scale bars = 100 μm (d = a–c); 10 μm (h = e–g).

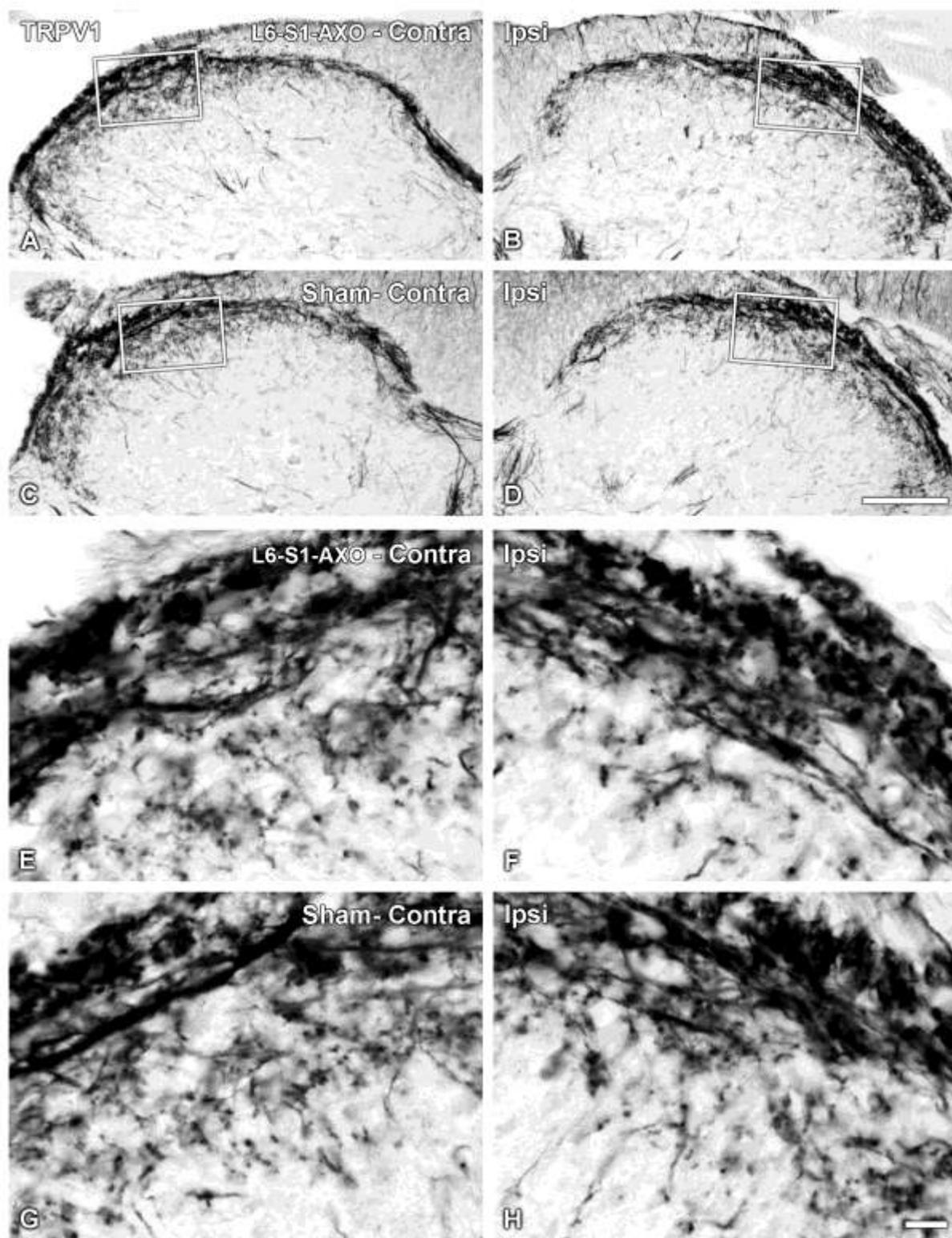
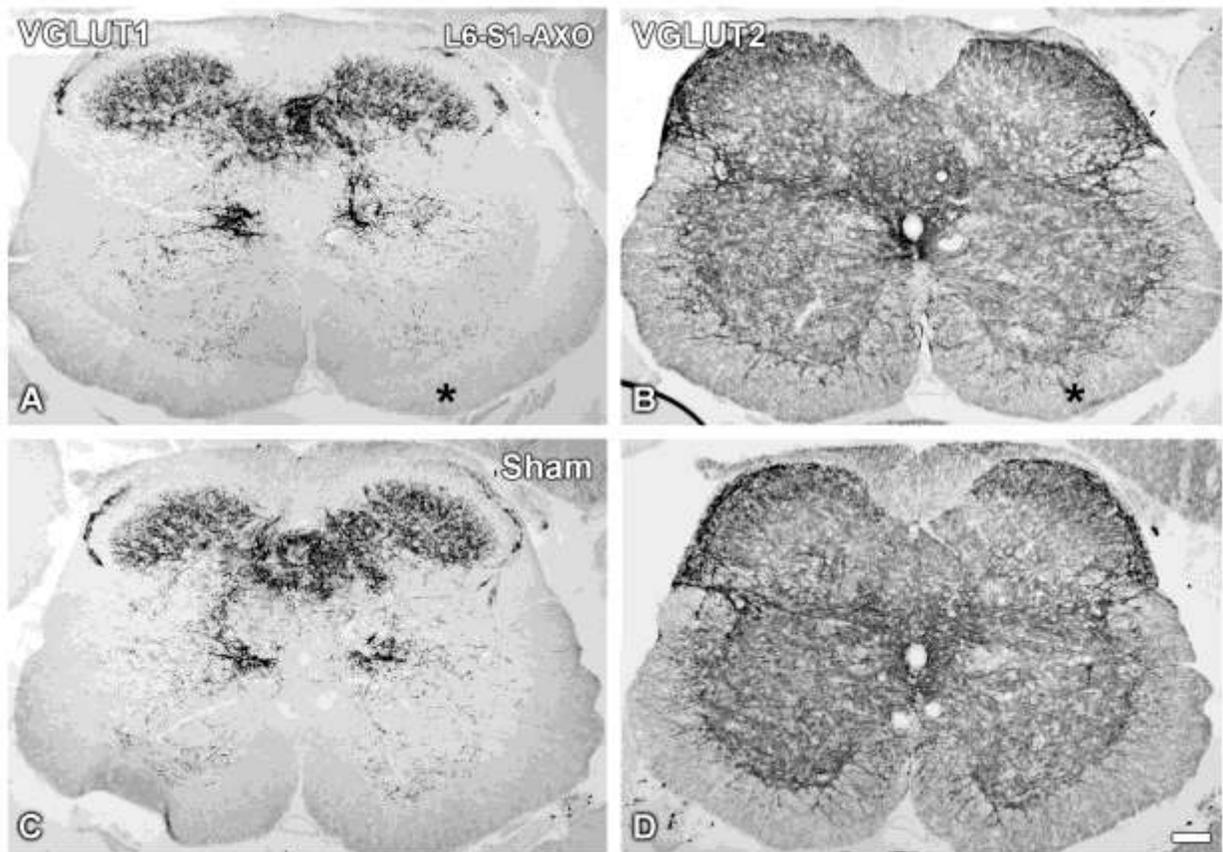


Figura PII.8. Visualización inmunohistoquímica del VGLUT1 y VGLUT2 en el asta dorsal LS de la médula espinal de ratones con axotomía de L6 – S1 y control.

Microfotografías de campo claro de secciones transversales LS del asta dorsal de la médula espinal de ratones con axotomía de L6 – S1 (a, b) y control (c, d) luego de la incubación con antisero del VGLUT1 (a, c) o el VGLUT2 (b, d) (asteriscos muestran el lado de la injuria). (a–d) Neurópilo VGLUT-IR se detecta en las láminas I, III – VII, las áreas periféricas del área X y las astas ventrales de los ratones con axotomía de L6 – S1 (a) y control (c). Esta distribución muestra diferentes densidades, siendo menor en las astas ventrales y no existentes en la lámina II (a, c). De lo contrario, se detecta un neurópilo VGLUT2-IR muy abundante en la sustancia gris de la médula espinal LS de ratones con axotomía de L6 – S1 (b) y control (d). El neurópilo pareciera ser ligeramente más denso en el asta dorsal superficial y alrededor del canal central (b, d). Ni la distribución ni la intensidad de la inmunorreactividad del VGLUT1 o el VGLUT2 pareciera diferir cuando se compara a ratones con axotomía de L6 – S1 y ratones control (a, b vs. c, d). Barra de escala = 100 μm (d = a – c).

Figure PII.8. Immunohistochemical visualization of VGLUT1 and VGLUT2 in the LS dorsal horn of the spinal cord of L6–S1-AXO and sham mice.

Bright-field photomicrographs of transverse sections of the mouse LS dorsal horn of the spinal cord of L6–S1-AXO (a, b) or sham (c, d) mice after incubation with VGLUT1 (a, c) or VGLUT2 (b, d) antisera (asterisks show injury side). a–d VGLUT1-IR neuropil is detected in laminae I, III–VII, the outer aspects of area X and the ventral horn of L6–S1-AXO (a) and sham (c) mice. Such distribution shows different densities, being lesser in the ventral horns and nonexistent in lamina II (a, c). In contrast, very abundant VGLUT2-IR neuropil is detected in the gray matter of the LS spinal cord of L6–S1-AXO (b) and sham (d) mice. The neuropil appears to be slightly denser in the superficial dorsal horn and around the central canal (b, d). Neither the distribution nor intensity of VGLUT1- or VGLUT2-LIs appears to differ when comparing L6–S1-AXO and sham mice (a, b vs. c, d). Scale bars 100 μm (d = a – c).



Proyecto III. La activación espinal del receptor tipo 1 del neuropéptido tirosina reduce la alodinia mecánica y al frío en ratas con compresión crónica del nervio ciático

Todas las ratas sometidas a LCC del nervio ciático mostraron cambios en la postura de la pata lesionada, incluyendo conducta de resguardo de la misma. Las ratas lesionadas nunca dieron muestras de conducta de dolor en las patas contralaterales (datos no mostrados).

Por otro lado, se observó que animales sham tratados con 10 μg de Leu³¹,Pro³⁴ mantuvieron niveles normales de respuesta conductual a lo largo del tiempo experimental. Asimismo, animales lesionados y tratados con ácido acético al 0,25% (vehículo del Leu³¹,Pro³⁴) mantuvieron claros signos de alodinia, compatible con la existencia de LCC (datos no mostrados). Por el contrario, la inyección intratecal de Leu³¹,Pro³⁴ en ratas con LCC indujo un efecto antialodínico dosis-dependiente (Figuras PIII.1-4). Tal efecto es descrito en detalle en las siguientes secciones.

Efecto dosis-dependiente de Leu³¹,Pro³⁴ intratecal sobre el umbral de retirada mecánico en ratas con LCC

Se observó que dosis de 2,5 y 5 μg no indujeron cambios significativos en el umbral de retirada frente a un estímulo mecánico en ratas con LCC; los animales presentaron alodinia mecánica a lo largo de los 90 minutos evaluados (Figuras PIII.1A, B). Sin embargo, los animales tratados con 5 μg mostraron una tendencia hacia el incremento del umbral de retirada mecánico claramente diferenciable de la ausencia de efecto a dosis más bajas (Figuras PIII.1A, B). Por el contrario, dosis de 7 μg o más indujeron efecto antialodínico mecánico estadísticamente significativo (Figuras PIII.1C-E). Se observó que la disminución de la alodinia mecánica comenzó entre los 15 (7 μg ; $P < 0,001$ vs. basal) y 30 minutos (10, 20 μg ; $P < 0,01$ vs. basal) de aplicado el agonista. Los máximos efectos antialodínicos alcanzados se

observaron entre los 15 y 45 minutos (7 μg), 30 y 45 minutos (10 μg) y 30 y 75 minutos (20 μg). La duración del efecto antialodínico fue de hasta 90 minutos (final del experimento), aunque la misma dependió de la dosis utilizada (Figura PIII.1C-E). Así, mientras que la alodinia mecánica de animales tratados con dosis de 7 y 10 μg retornó a niveles basales a los 90 minutos, los animales tratados con dosis de 20 μg mantuvieron niveles elevados de retirada del umbral mecánico incluso hasta los 90 minutos ($P < 0,05$ vs. basal) (Figura PIII.1E).

La comparación de las curvas dosis-respuesta mostró una diferencia significativa entre curvas ($P < 0,05$, ANOVA de dos vías), observándose diferencias significativas entre la dosis de 2,5 μg y las dosis de 7 ($P < 0,05$), 10 y 20 μg ($P < 0,01$). El análisis del efecto de las diferentes dosis en cada tiempo evaluado (ANOVA) arrojó diferencias significativas a los 30 ($P < 0,05$), 45 ($P < 0,01$), 60 ($P < 0,01$), 75 ($P < 0,01$) y 90 minutos ($P < 0,01$), y confirmó que las dosis más altas (7, 10 y 20 μg) presentan un efecto antialodínico mayor y de más larga duración que las dosis más bajas (2,5 y 5 μg) (Figura PIII.1F). El análisis de área bajo la curva demostró una diferencia significativa entre áreas ($P < 0,001$), y confirmó la relación directa entre dosis y potencia analgésica de Leu³¹,Pro³⁴ ($P < 0,05$, 7 y 10 μg vs. 2,5 μg ; $P < 0,001$, 20 μg vs. 2,5 μg ; $P < 0,01$, 20 μg vs. 5 μg) (Figura PIII.2).

Efecto dosis-dependiente de Leu³¹,Pro³⁴ sobre la frecuencia de retirada frente al estímulo frío en ratas con LCC

Se observó que dosis de 2,5; 5 y 7 μg no indujeron cambios significativos en la frecuencia de retirada de la pata frente a un estímulo frío en ratas con LCC; los animales presentaron alodinia térmica a lo largo de los 108 minutos evaluados

(Figura PIII.3A - C). Sin embargo, los animales tratados con 5 y 7 μg mostraron una tendencia hacia la disminución de la frecuencia de retirada por estímulo frío claramente diferenciable de la ausencia de efecto a dosis más bajas (Figuras PIII.2A, B). Por el contrario, dosis de 10 y 20 μg mostraron efecto antialodínico térmico estadísticamente significativo (Figura PIII.3D, E). Se observó que la disminución de la alodinia térmica comenzó entre los períodos de 16 - 32 (10 μg ; $P < 0,01$ vs. basal) y 32 - 48 minutos (20 μg ; $P < 0,05$ vs. basal) de aplicado el agonista (Figura PIII.3D, E). El efecto antialodínico térmico fue de corta duración con ambas dosis mencionadas, siendo ligeramente más duradero en el caso del uso de 10 μg (Figura PIII.3D). Sin embargo, mientras que los animales tratados con 10 μg retornaron a niveles de alodinia térmica cercanos a valores basales, los animales tratados con 20 μg mostraron una recuperación más lenta (Figura PIII.3E).

La comparación de las curvas dosis-respuesta mostró diferencia significativa entre curvas ($P < 0,05$, ANOVA de dos vías), observándose diferencias significativas entre la dosis de 2,5 μg y las dosis de 7, 10 ($P < 0,05$) y 20 μg ($P < 0,01$) (Figura PIII.3F). El análisis del efecto de las diferentes dosis en cada período evaluado (ANOVA) arrojó diferencias significativas a los 16-32 ($P < 0,001$), 32-48 ($P < 0,001$), 48-64 ($P < 0,05$), 64-80 ($P < 0,01$), 80-96 ($P < 0,01$) y 96-108 ($P < 0,05$), y confirmó que las dosis más altas (10 y 20 μg) tienen un efecto antialodínico mayor y de más larga duración que las dosis más bajas (2,5 y 5 μg) (Figura PIII.2F). El análisis de área bajo la curva demostró una diferencia significativa entre áreas ($P < 0,01$), y confirmó la presencia de diferencias significativas al comparar las dosis de 10 y 20 μg con 2,5 μg ($P < 0,05$ vs. 10 μg , $P < 0,01$ vs. 20 μg) (Figura PIII.4).

Figura PIII.1 (A – E) Gráficos que muestran el umbral de retirada de la pata frente al estímulo mecánico en grupos de ratas con LCC tratadas con (A) 2,5 µg, (B) 5 µg, (C) 7 µg, (D) 10 µg y (E) 20 µg de Leu³¹Pro³⁴ (los asteriscos en las figuras A-E muestran las diferencias significativas existentes entre cada punto evaluado en el tiempo y la respuesta conductual basal a tiempo 0; la figura (F) muestra la comparación entre todas las curvas estudiadas). (A-E) Se observa un aumento dosis – dependiente del umbral de retirada mecánico, en particular a dosis de 7 µg o más. Las dosis más bajas no inducen cambios significativos en el umbral mecánico, aunque es posible observar una tendencia hacia el aumento del mismo con la dosis de 5 µg. (F) La comparación de las curvas obtenidas para cada dosis mostró diferencias significativas en diferentes momentos de tiempo evaluados, entre las curvas de 2,5 y 7 µg (*); 2,5 y 10 µg (+); 2,5 y 20 µg (#); y 5 y 20 µg (σ).

Figure PIII.1. (A-E) Graphs showing the mechanical withdrawal threshold of the hindpaw of rats with CCI treated with (A) 2.5 µg, (B) 5 µg, (C) 7 µg, (D) 10 µg and (E) 20 µg of Leu³¹Pro³⁴.(the asterisks in figures A-E show the significant differences between the different evaluated timepoints and the basal behavioural response at 0 minutes; figure (F) shows the comparison between all of the analyzed curves). (A-E) A dose-dependent increase of the mechanical withdrawal threshold is observed, particularly with doses of 7 µg or higher. The lower doses do not induce significant changes in the mechanical withdrawal threshold, although is possible to observe a tendency to an increase of the withdrawal threshold with 5 µg. (F) The comparison of the curves corresponding to each dose showed significant differences at different evaluated timepoints between the curves of 2.5 and 7 µg (*); 2.5 and 10 µg (+); 2.5 and 20 µg (#) and 5 and 20 µg (σ).

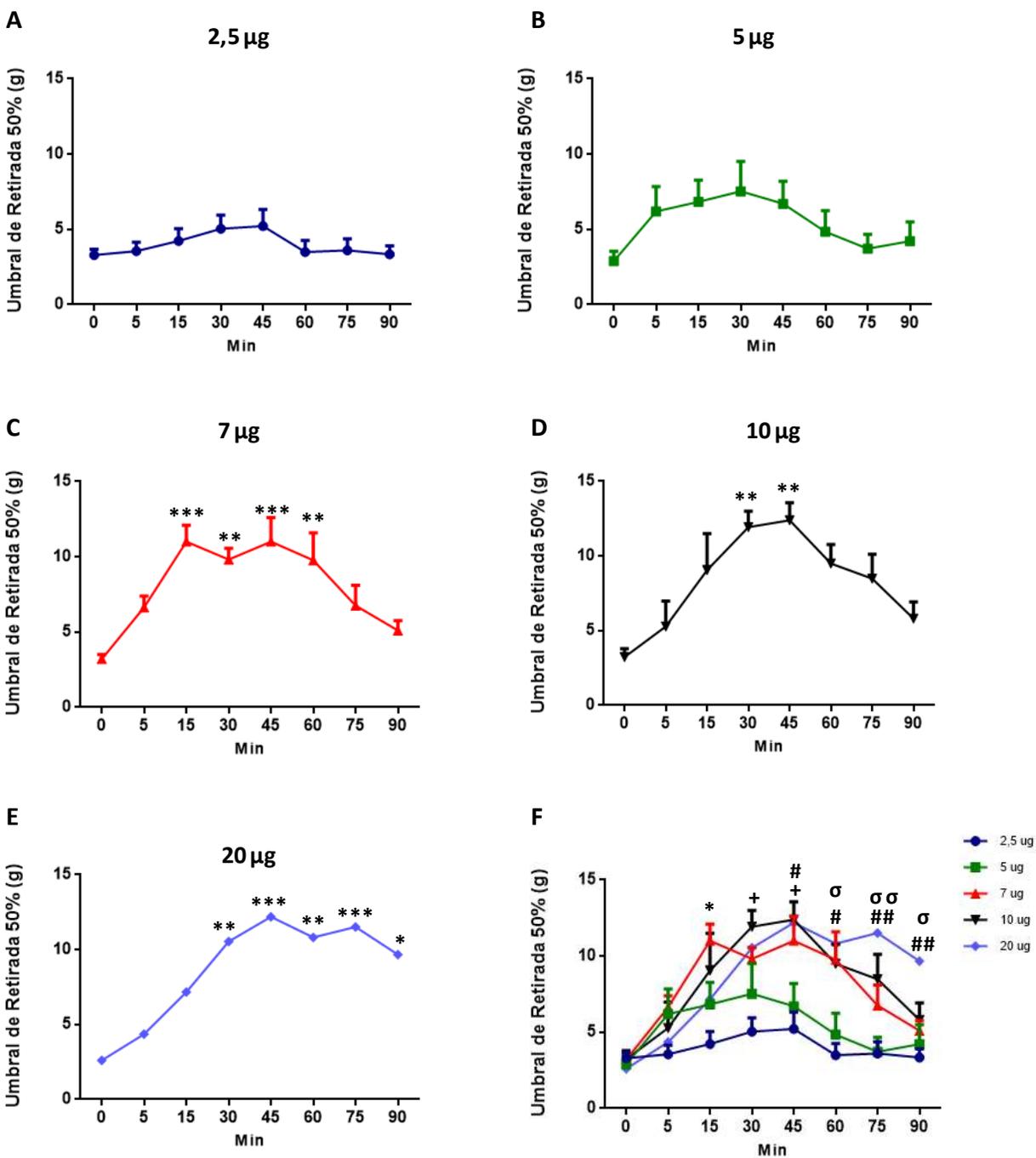


Figura PIII.2 Análisis de área bajo la curva para cada dosis estudiada durante los 90 minutos de la evaluación de alodinia mecánica. Se observa que la administración de dosis progresivamente mayores de Leu³¹Pro³⁴ inyectadas en ratas con LCC induce un aumento del área bajo la curva, alcanzando diferencias significativas al comparar las dosis de 5 vs. 20 µg (σσ, P<0,01) y 7, 10 (#, P<0,05), y 2.5 vs. 20 µg (###, P<0,001).

Figure PIII.2 Analysis of the area under the curve for each studied dose during the 90 minutes that the mechanical allodynia was evaluated. The administration of the progressively higher doses of Leu³¹Pro³⁴ injected in rats with ICC induce an increase of the area under the curve, reaching significant differences when comparing doses of 5 vs. 20 µg (σσ, P<0,01) and 7, 10 (#, P<0,05) and 2.5 vs. 20 µg (###, P<0,001).

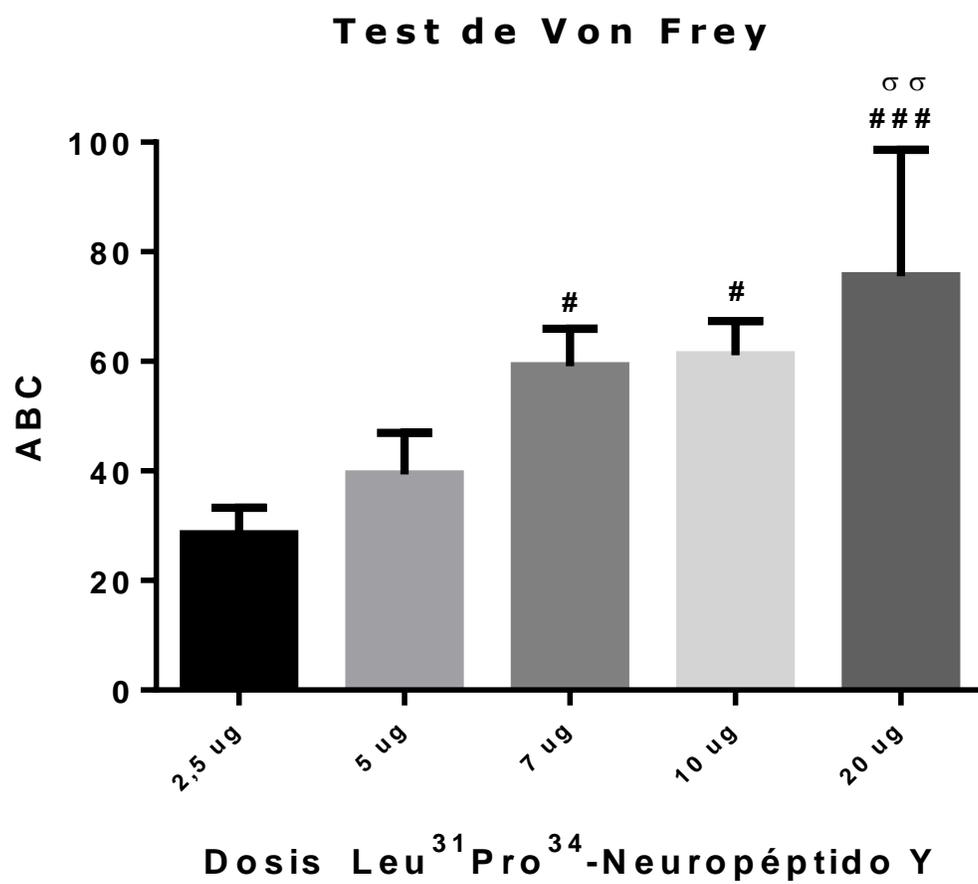


Figura PIII.3 (A – E) Gráficos que muestran el umbral de retirada de la pata frente al estímulo frío en grupos de ratas con LCC tratadas con 2,5 µg (A), 5 µg (B), 7 µg (C), 10 µg (D) y 20 µg (E) de Leu³¹Pro³⁴ (los asteriscos en las figuras A-E muestran las diferencias significativas existentes entre cada punto evaluado en el tiempo y la respuesta conductual basal a tiempo 0; la figura (F) muestra la comparación entre todas las curvas estudiadas). (A - E) Se observa una disminución significativa de la frecuencia de retirada de la pata frente al estímulo frío frente a la administración intratecal de 10 y 20 µg, a los 16-32 (10 µg) y 32-48 min (10 y 20 µg). Las dosis más bajas no indujeron cambios significativos, aunque es posible observar una clara tendencia hacia la disminución de la frecuencia de retirada con dosis de 5 y 7 µg. A los 108 min, todas las dosis excepto la de 20 µg, recuperan su frecuencia basal (compárese E con A-D). (F) La comparación de las curvas obtenidas para cada dosis mostró diferencias significativas en momentos específicos de tiempo evaluados, entre las curvas de 2,5 y 7 µg (δ); 2,5 y 10 µg (+); 2,5 y 20 µg (σ); y 10 y 20 µg (#).

Figure PIII.3 (A-E) Graphs showing the cold withdrawal threshold of the hindpaw of rats with CCI treated with (A) 2.5 µg, (B) 5 µg, (C) 7 µg, (D) 10 µg and (E) 20 µg of Leu³¹Pro³⁴ (the asterisks in figures A-E show the significant differences between the different evaluated timepoints and the basal behavioural response at 0 minutes; figure (F) shows the comparison between all of the analyzed curves). (A-E) A decrease of the withdrawal frequency of the hindpaw is observed when a cold stimuli is applied after and intrathecal administration of 10 and 20 µg, at 16-32 (10 µg) and 32-48 min (10 and 20 µg). The lower doses did not induce significant changes in the cold withdrawal threshold, although is possible to observe a tendency to an increase of the withdrawal threshold with 5 and 7 µg. At 108 minutes all of the doses except 20 µg, recover their basal frequency (compare E with A-D). (F) The comparison of the curves corresponding to each dose showed significant differences at different evaluated timepoints between the curves of 2.5 and 7 µg (δ); 2.5 and 10 µg (+); 2.5 and 20 µg (σ) and 10 and 20 µg (#).

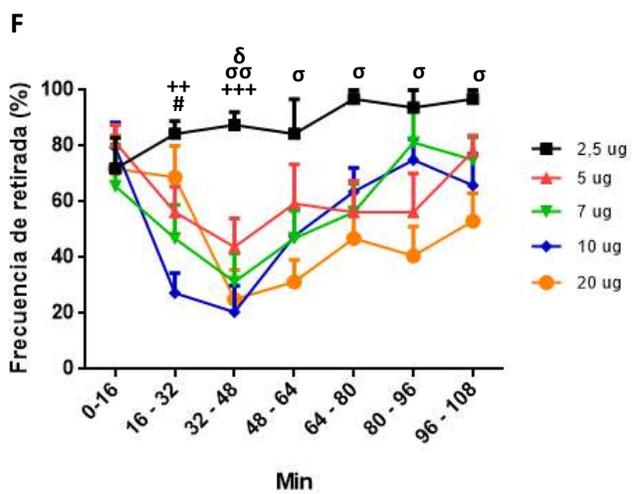
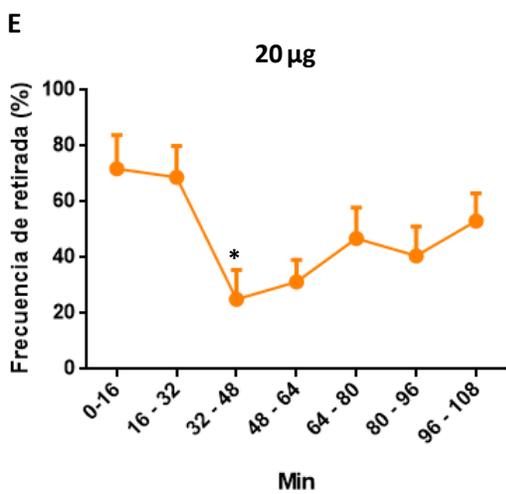
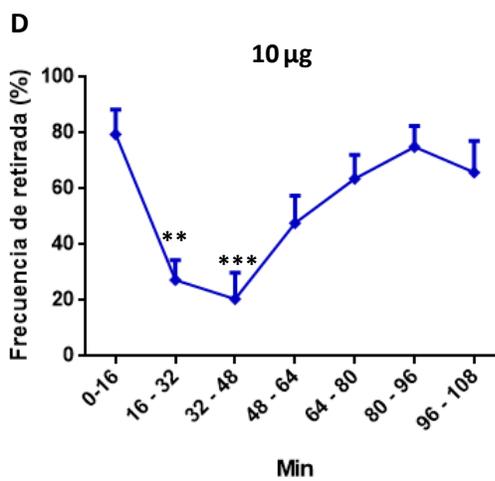
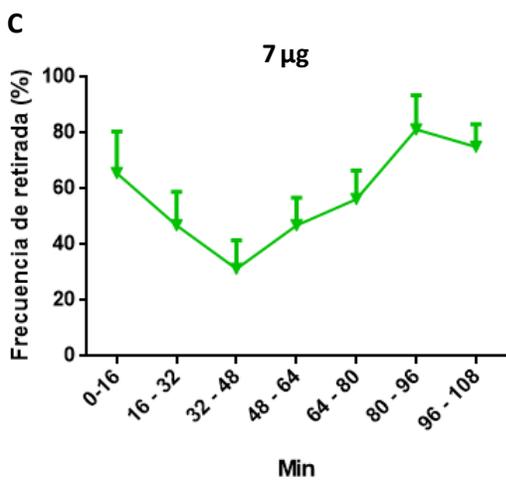
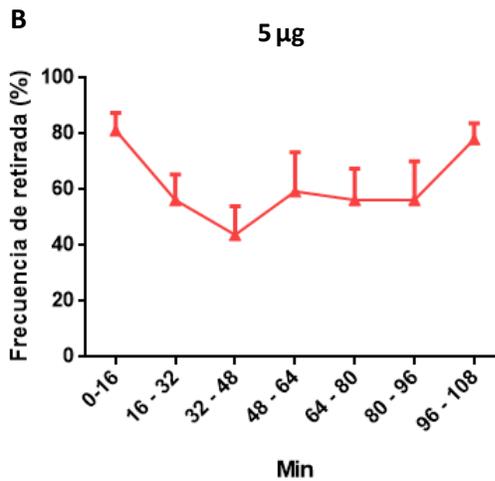
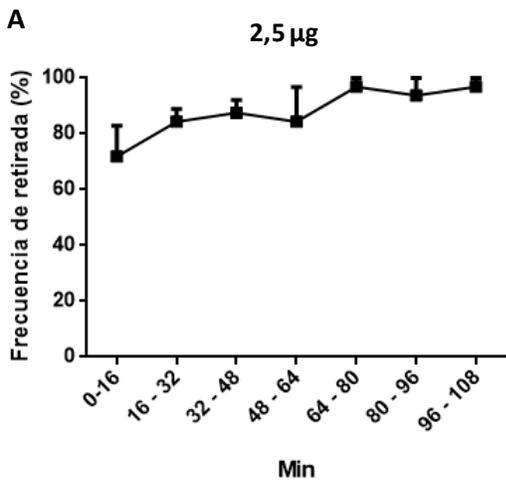
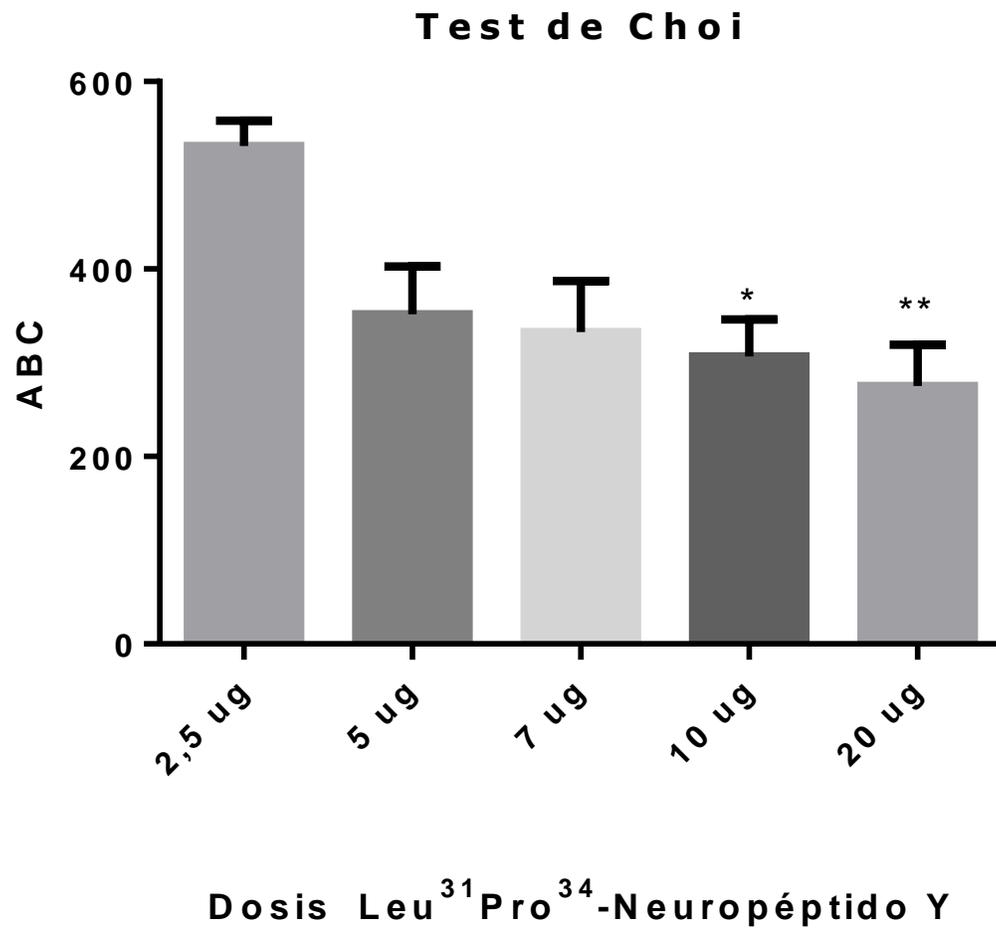


Figura PIII.4 Análisis de área bajo la curva para cada dosis estudiada durante los 108 minutos de duración de la evaluación de alodinia mecánica. Se observa que la administración de dosis progresivamente mayores de Leu³¹Pro³⁴ inyectadas en ratas con LCC induce una disminución del área bajo la curva, alcanzando diferencias significativas al comparar las dosis de 2.5 vs. 10 µg (*, P< 0,05), y 2.5 vs. 20 µg (**, P< 0,01).

Figure PIII.4 Analysis of the area under the curve for each studied dose during the 108 minutes that the cold allodynia was evaluated. The administration of the progressively higher doses of Leu³¹Pro³⁴ injected in rats with ICC induce an increase of the area under the curve, reaching significant differences when comparing doses of 2.5 vs. 10 µg (*, P< 0,05), y 2.5 vs. 20 µg (**, P< 0,01).



Proyecto IV. Administración sistémica de células derivadas de la médula ósea, promotoras de la regeneración axonal y acción analgésica en el modelo de degeneración walleriana.

Caracterización de las CMMO previo al trasplante

Se identificaron tres fenotipos diferentes por observación microscópica, revelando una población heterogénea (Figura PIV.1A). Los análisis por RT-PCR mostraron que las CMMOs expresan el ARNm de CD34, CD90 y S100 β (Figura PIV.1B), pero no se encontró el ARNm del p75NTR, GFAP, MBP o el P₀ (datos no mostrados). El estudio por citometría de flujo usando FSC/SSC y CD45/SSC "gate" reveló que la purificación fue efectiva en el enriquecimiento del porcentaje de células mononucleares (Figura PIV.1C₁, región C, D y E) y en la reducción del número de otros tipos celulares tales como los granulocitos (Figura PIV.1C₁, región A) y precursores eritroides (Figura PIV.1C₁, región B) [356]. En la fracción CMMO, se hallaron dos subpoblaciones, una con baja y otra con alta expresión de CD45 (Figura PIV.1C₂). El análisis de diferentes marcadores celulares reveló la presencia de una proporción pequeña de células CD45^{bajo}/CD34⁺ ($2.3 \pm 0.78\%$, Figura PIV.1C₃ y 1C₄), una pequeña proporción de células CD45^{bajo}/CD105⁺ ($2.75 \pm 0.16\%$, Figura PIV.1C₃ y 1C₄), y una gran proporción de células CD45⁺/CD90⁺ ($34.1 \pm 2.2\%$, Figura PIV.1C₃ y 1C₄). También fueron hallados algunos linfocitos T (CD45^{bajo}/CD3⁺; 9.52%), mientras que un porcentaje mayor de células CD45^{alto} expresando CD68 y CD11b fue observado con patrones y niveles similares (Figura PIV.1C₃ y 1C₄). En términos de marcadores de CS, se observaron niveles apenas detectables de p75NTR, S100b y MBP en las CMMO (Figura PIV.1C₃ y 1C₄). Como era de esperar, la región de precursores eritroides fue negativa para todos los marcadores analizados, mientras que los granulocitos remanentes fueron todos CD11b⁺ y débilmente CD68⁺ (data no mostrada).

El uso de CMMOs marcadas con el trazador celular CMTMR (Figura PIV.1D₁) permitieron confirmar la migración exclusiva de estas células hacia el nervio ipsilateral (Figura PIV.1D₂), como fuera previamente descrito [357]. Se utilizó análisis microscópico de secciones semifinas para evaluar la morfología del nervio. Los animales naif exhibieron axones intactos, CS y fibroblastos (Figura PIV.1E). Por el contrario, las áreas distales mostraron axones irregulares con depósitos de mielina y axón (Figura PIV.1E, asterisco) y células que semejan aquellas mostradas en la Figura PIV.1A (Figura PIV.1E, cabezas de flecha), las cuales carecen del fenotipo de células tisulares constitutivas.

Efecto de las CMMO en la morfología de los nervios lesionados

La evaluación morfológica fue llevada a cabo mediante análisis de cortes semifinos de las secciones de todos los nervios en estudio. Como no se observaron diferencias significativas entre los nervios de ratas naif, y áreas proximales de nervios ipsilaterales en ratas lesionadas en ninguno de los días post-lesión analizados (Figura PIV.2D), los ensayos se concentraron en la zona de compresión del nervio y áreas distales a la misma (Figuras PIV.2).

Análisis ultraestructural

En comparación con nervios evaluados de ratas control o en zonas proximales a la lesión (Figura PIV.2D-a, b), a los 3 días post-lesión (DPL) se observó degeneración axonal pronunciada, evidenciada por una reducción importante en el porcentaje de axones (Figura PIV.2A), alteraciones en la mielinización axonal y aparición de residuos de mielina (datos no mostrados), indicativo del comienzo del

proceso de *degeneración walleriana (DW)*, en las zonas de compresión del nervio ciático y distal a la compresión, de ratas lesionadas no-tratadas como tratadas con CMMO.

A los 7 DPL, los animales no-tratados presentaron franca DW, tanto a nivel de la zona comprimida como distal, demostrado por la persistencia de porcentajes reducidos de axones ($10,53 \pm 1,55$; Figura PIV.2A, panel izquierdo), con grandes cantidades de residuos mielínicos y axonales (datos no mostrados). Por el contrario, las ratas lesionadas y tratadas con CMMO mostraron una recuperación parcial en la morfología axonal y una mayor cantidad de axones ($37,48 \pm 3,79$; $p < 0,001$, ratas tratadas vs. no-tratadas; Figura PIV.2A, panel izquierdo). En la zona distal, no se observaron diferencias en el porcentaje de axones entre ambos grupos (Figura PIV.2A, panel derecho), aunque los animales tratados con CMMO presentaron una morfología axonal menos alterada (Figura PIV.1D-e, f).

A los 14 DPL, las ratas no-tratadas mantuvieron la reducción del porcentaje de axones, tanto en la zona de compresión como en áreas distales de los nervios lesionados, en comparación con el grupo tratado con las CMMO (zona de compresión: $58,86 \pm 3,21$ vs $81,55 \pm 6,5$, $p < 0.01$, respectivamente; área distales: $36,2 \pm 4,78$ vs $82,3 \pm 7,14$, $p < 0,001$, respectivamente) (Figura PIV.2A). Más aún, los animales tratados con CMMO evidenciaron un alto grado de mielinización (Figura PIV.2D, c-d).

Finalmente, a los 21 DPL, el grupo no-tratado comenzó a dar señales de recuperación, con incremento marcado del porcentaje de axones, aunque permaneciendo por debajo de los valores observados en animales tratados con CMMO (zona de compresión: $65,82 \pm 4,23$ vs. $114,32 \pm 6,44$, $p < 0,001$,

respectivamente; áreas distales: $74,29 \pm 4,97$ vs. $117,02 \pm 10,47$, $p < 0,001$, respectivamente) (Fig. PIV.2A). Así, los animales tratados con CMMO mostraron una recuperación virtualmente completa a los 21 DPL, en comparación con los animales no tratados.

Un análisis más detallado, diferenciando axones altamente mielinizados, demostró que a los 7 días DPL la zona de compresión contuvo una menor proporción de este tipo de axones en los animales no-tratados, en comparación con los animales tratados con las CMMO, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($47,22 \pm 13,1$ vs. $82,59 \pm 3,84$, respectivamente) (Figura PIV.2B, panel izquierdo). A los 14 DPL, los animales no-tratados mostraron una brusca disminución del porcentaje de axones a comparación de los animales tratados con las CMMO que presentaron una leve disminución de este tipo de axones ($7,29 \pm 4,01$ vs. $65,63 \pm 4,36$, $p < 0,001$, respectivamente) (Figura PIV.2B, panel izquierdo). Por último, a los 21 DPL los animales no-tratados y tratados con CMMO mantuvieron una proporción de axones similares a lo ocurrido en el día 14 DPL, no presentando mayores modificaciones ($10,36 \pm 2,35$ vs. $59,72 \pm 5,43$, $p < 0,001$, respectivamente) (Figura PIV.2B, panel izquierdo). En áreas distales, se observó una disminución en el porcentaje de axones altamente mielinizados en ambos grupos experimentales, aunque tal reducción fue más evidente en ratas no-tratadas que en ratas tratadas con CMMO, y comenzando a partir del día 7 DPL ($7,037 \pm 5,57$ vs. $48,95 \pm 12,32$, $p < 0,001$, respectivamente) (Figura PIV.2B, panel derecho). A los 14 DPL la ratas no-tratadas mantuvieron una baja proporción de axones, mientras que las tratadas con las CMMO continuaron disminuyendo su cantidad de axones y acercándose a valores similares a la de los animales no-tratados ($13,39 \pm$

5,5 vs. $26,83 \pm 5,69$, $p < 0,05$, respectivamente) (Figura PIV.2B, panel derecho). A los 21 DPL, los animales no-tratados y los tratados con CMMO presentaron una baja cantidad de axones altamente mielinizados en la zona distal a la lesión ($13,65 \pm 2,23$ vs. $19,42 \pm 2,76$, no significativo, respectivamente) (Figura PIV.2B, panel derecho).

El análisis del índice de relación (G-ratio) confirmó las observaciones hechas mediante cuantificación axonal (Fig. PIV.2C), sugiriendo que la desmielinización altera el grosor de las vainas de mielina (las vainas más delgadas son indicativas de una mayor y severa desmielinización), sin alterar significativamente el grosor de las líneas intraperiódicas y de mayor densidad (datos no mostrados).

Análisis Inmunohistoquímico

La MBP, la proteína más sensible para el estudio de DW en este modelo experimental [347], fue utilizada para mostrar la evolución del proceso de mielinización luego de la lesión. Las comparaciones entre las ratas no-tratadas y las tratadas con las CMMO se realizaron a los 7 y 14 DPL, dos momentos en el tiempo que muestran claros signos de degeneración (Figura PIV.3). El análisis inmunohistoquímico reveló que en ambos grupos experimentales los nervios contralaterales presentaron IR continua para la MBP. A los 7 DPL, la discontinuidad y la reorganización en racimos de la MBP en las áreas proximales y distales fue claramente observada en ratas no-tratadas, al contrario de una IR continua para la MBP detectada en las ratas tratadas con las CMMO (Fig. PIV.3A). A los 14 DPL, las ratas no-tratadas permanecían en el período de desmielinización, pero exhibieron una menor cantidad de racimos probablemente debido a la degradación de la

mielina [358]. Por el contrario, las ratas tratadas con las CMMO mostraron una menor cantidad de racimos y una mejoría en la IR para la MPB a lo largo del nervio ipsilateral (Fig. PIV.3B).

Análisis de la expresión del marcador axonal NF-200 demostró que el tratamiento con CMMO previene también la degradación de fibras axonales (figura PIV.4).

Efectos de las CMMO sobre la funcionalidad de los nervios dañados

Se llevaron a cabo análisis electrofisiológicos para determinar si las mejorías histológicas se correlacionan con la recuperación de la funcionalidad nerviosa en animales tratados con las CMMO. No se observaron diferencias significativas entre nervios sanos y contralaterales en ninguno de los tiempos de sobrevivencia. La Figura PIV.5 muestra un aumento en la latencia distal entre los días 3 y 21 luego de la lesión en las ratas no-tratadas y tratadas con las CMMO. Recién se observó una recuperación completa de los valores de latencia distal a los 60 DPL (Figura PIV.5A), indicativo de un retraso en la recuperación de la funcionalidad respecto a las mejorías morfológicas (quizás debido a un incremento en el número total de axones pero no en aquellos mielinizados). Por otro lado, se observó una disminución aguda en la amplitud de la *medición de potencial compuesto muscular de acción (CMAP, según sus siglas en inglés)* entre los días 3 y 21 luego de la injuria para las ratas no-tratadas y entre los días 3 y 7 después de la lesión para los animales tratados con las CMMO, lo que sugiere un compromiso axonal. Sin embargo, a los 14 DPL, las ratas tratadas con las CMMO mostraron una recuperación sustancial en la amplitud de CMAP, sugiriendo la presencia de una regeneración axonal. En ambos

grupos experimentales, se observó una recuperación de la amplitud casi total a los 60 días después de la injuria, indicando el restablecimiento de la funcionalidad axonal (Figura PIV.5B).

Efectos de las CMMO sobre la conducta dolorosa luego de la lesión nerviosa

Las ratas no tratadas presentaron una disminución del umbral de retirada frente al estímulo mecánico ipsilateral al día 7 después de la lesión, volviéndose más notorio a los 14 y 21 DPL. Esto se siguió de una recuperación progresiva comenzando al día 28 después de la lesión y alcanzando el umbral de retirada mecánica de los animales control a partir del día 35 después de la lesión (Figura PIV.6A). Por el contrario, el umbral de retirada mecánica en las ratas tratadas con las CMMO no fue alterado, permaneciendo comparable a las ratas control a lo largo de todos los tiempos de sobrevida analizados (Figura PIV.6A). El umbral de retirada mecánica del lado contralateral de todos los grupos experimentales, no exhibió cambios a lo largo de los diferentes tiempos de sobrevida (Figura PIV.6B).

La comparación entre los grupos tratados con CMMO y no-tratados a cada DPL mostró diferencias estadísticas significativas a los días 14 y 21 después de la lesión. Las comparaciones entre el grupo control y las tratadas con las CMMO solo mostraron diferencias significativas a los 14 DPL (Figura PIV.6A, B).

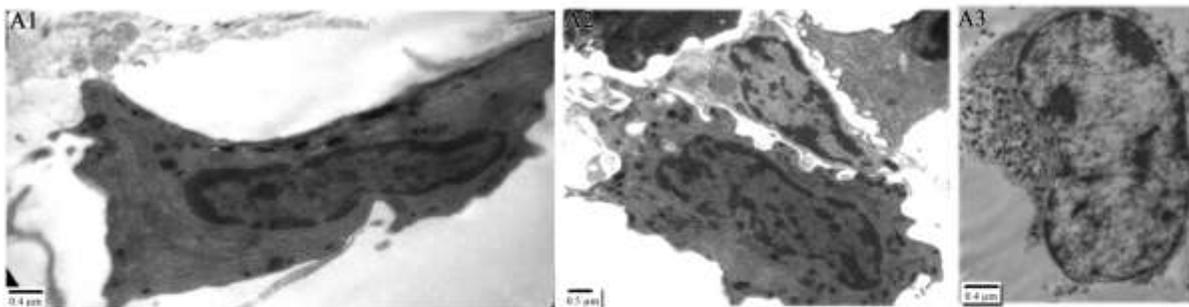
Figura PIV.1 Caracterización morfológica (n=3) y bioquímica (n=6) de las CMMO.

A1-3: Microfotografías de microscopía electrónica de las CMMO aisladas frescas (12000X, barra de escala: 0,4 μm). B: productos de la RT-PCR corridos en un gel al 1% de agarosa para la detección de marcadores de células multipotentes CD34 (B1), CD90 (B2) y el marcador de CS S100 β (B3), visualizado con Sybr Safe. Las reacciones sin el templado de ADNc fueron utilizadas como controles negativos. En todos los casos, de izquierda a derecha: marcador, control negativo y muestras de las CMMO independientes. C: análisis por citometría de flujo de las CMMO; la línea punteada muestra las diferentes subpoblaciones y sus proporciones, A: granulocitos, B: precursores eritroides, C: blastos, D: linfocitos, E: monocitos (C1); histograma de la expresión del CD45 (violeta) y autofluorescencia de las células (celeste) (C2); histograma de marcadores de células multipotentes CD34 y CD90 y marcadores de células madre mesenquimales CD105; marcadores de CS S100 β , p75NTR y MBP (C3); línea punteada de la expresión de CD3, CD68 y CD11b (C4). Cuantificación de las células positivas para cada marcador utilizando el software FlowJ (C5). D: Células marcadas con el rastreador naranja de células CMTMR (rojo) y Hoechst (azul) (D1); análisis de la migración de las CMMO-CMTMR en un nervio de un animal control y el area distal del nervio ipsilateral en un animal no tratado y otro tratado con CMMO (D2). E: Imágenes de cortes semifinos de un nervio de un animal control y el area distal del nervio ipsilateral de un animal no tratado y otro tratado con CMMO 3 días después de la lesión. Los asteriscos indican los desechos de mielina y de axón; las cabeza de flecha indican una célula compatible con fenotipo CMMO (40X, barra de escala 20 μm).

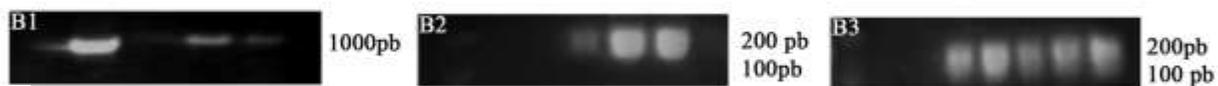
Figure PIV.1 Morphological (n=3) and biochemical (n=6) characterization of BMMC.

A1-3: electron microscopy photomicrographs of freshly isolated BMMC (12000X, scale bar: 0.4 μm). B: RT-PCR products run in 1% agarose gel for detection of multipotent cell markers CD34 (B1), CD90 (B2) and SC marker S100 β (B3), visualized with Sybr Safe. Reactions without template cDNA were run as negative controls. In all cases, from left to right: marker, negative control and independent BMMC samples. C: flow cytometry analysis of BMMC; dot plot showing different subpopulations and their proportions, A: granulocytes, B: erythroid precursors, C: blasts, D: lymphocytes, E: monocytes (C1); histogram of CD45 expression (purple) and autofluorescence of cells (light blue) (C2); histogram of multipotent markers CD34 and CD90 and mesenchymal stem cell marker CD105; SC markers S100 β , p75NTR and MBP (C3); dot plot of CD3, CD68 and CD11b expression (C4). Quantification of cells positive for each marker using FlowJ software (C5). D: Cells dyed with cell tracker orange CMTMR (red) and Hoechst (blue) (D1); analysis of BMMC-CMTMR migration in a naïve nerve and the distal area of the ipsilateral nerve of non-treated and BMMC-treated animals (D2). E: Semi-thin section images of a naïve nerve and the distal area of the ipsilateral nerve of non-treated and BMMC-treated rats 3 DPI. Asterisks indicate myelin and axon debris, arrowhead indicates a BMM-like cell (40X, scale bar: 20 μm).

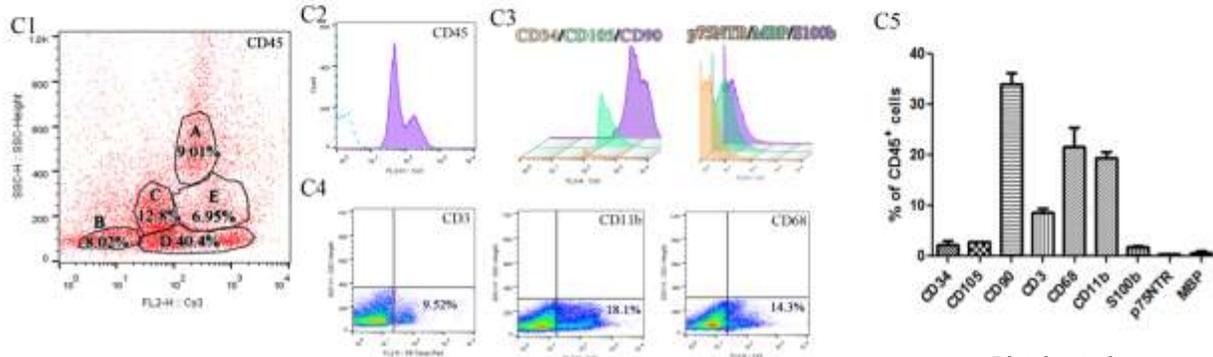
A



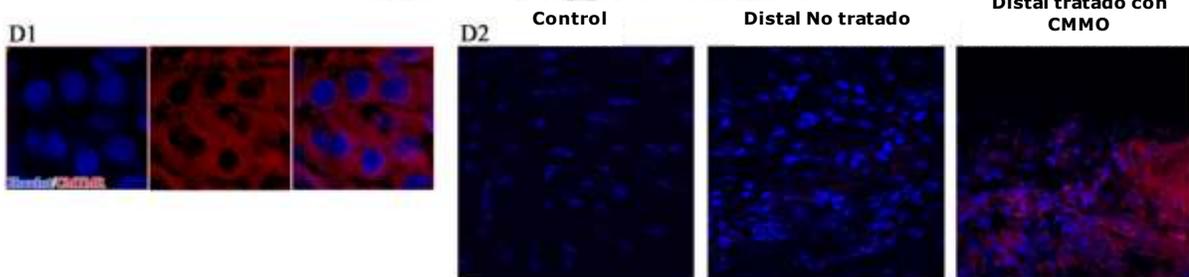
B



C



D



E

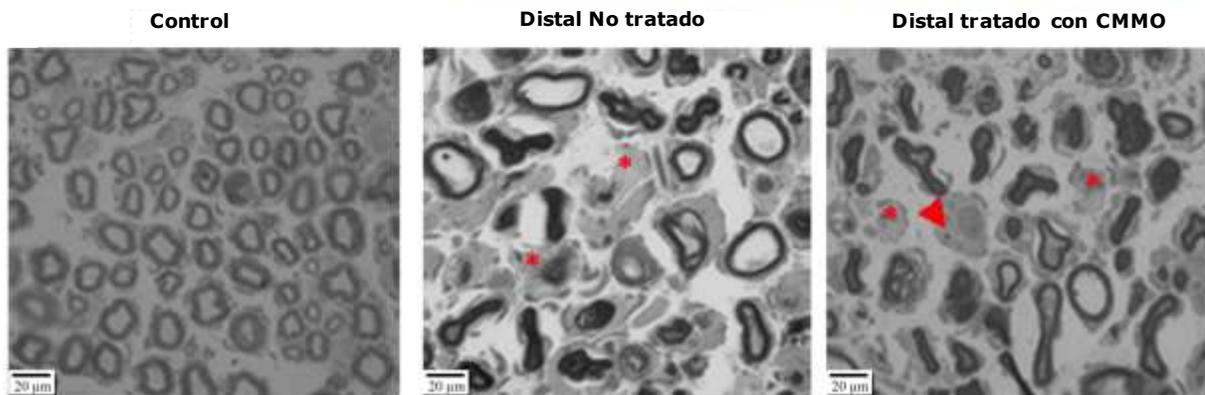
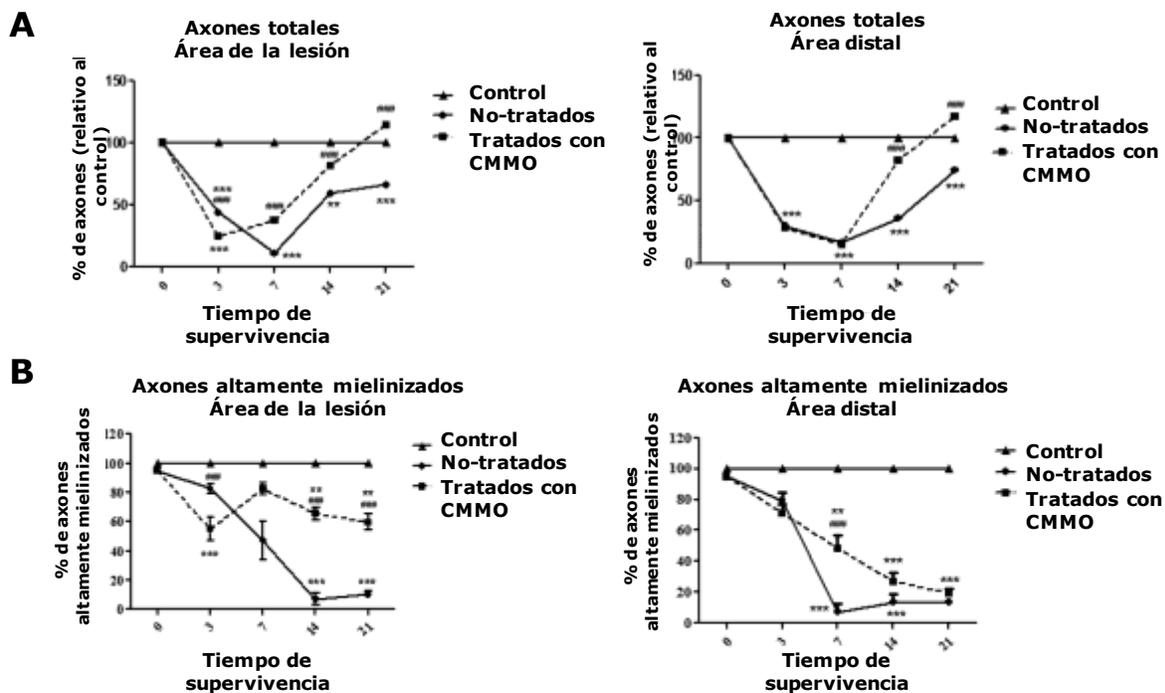


Figura PIV.2 Análisis de cortes semifinos de axones de animales con compresión transitoria del nervio ciático, no tratados y tratados con CMMO a diferentes tiempos de sobrevivida (n=3). A-C. Gráficos de cuantificación. A: porcentaje de axones en nervios de animales control y de las áreas lesionadas (panel izquierdo) y distales (panel derecho) de ambos grupos experimentales en función del tiempo de sobrevivida. B: porcentaje de axones altamente mielinizados en nervios de animales control y de las áreas lesionadas (panel izquierdo) y distales (panel derecho) de ambos grupos experimentales en función del tiempo de sobrevivida. C: G-ratio de nervios de animales control y las áreas lesionadas y distales del nervio ipsilateral de animales lesionados, no tratados y tratados con CMMO. Los valores se expresan como promedio \pm error estándar de la media. En todos los casos $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ (cada grupo experimental vs. ratas control) y $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, $\#\#\#p < 0.001$ (comparación entre los grupos experimentales). **Montaje inferior. Ejemplos de nervios utilizados para la cuantificación en cortes semifinos.** A, B: Nervio control y segmento proximal del nervio ipsilateral de una rata lesionada y no-tratada con CMMO, respectivamente. C, D: Área de compresión de nervios ipsilaterales de animales con compresión de 14 días de sobrevivida, no-tratados (NT) y tratados (T) con CMMO, respectivamente. E, F: Área distal de nervios ipsilaterales de animales con compresión de 7 días de sobrevivida, NT y T con CMMO. Barra de escala: 20 μm . Las flechas indican axones intactos; las cabezas de flecha indican axones irregulares; los asteriscos indican la mielina y remanentes axonales.

Figure PIV.2 Analysis of semi-thin sections of axonal bundles in non-treated and BMMC treated animals with sciatic nerve crush at different survival times (n=3, 40X). A-C. Quantification graphs. A: percentage of axons in naïve nerves and the crush (left panel) and distal (right panel) areas in both experimental groups as a function of survival time. B: percentage of highly myelinated axons in naïve nerves and in the crush (left panel) and distal (right panel) areas in both experimental groups as a function of survival time. C: G-ratio of naïve nerves and crush and distal areas of the ipsilateral nerve of nontreated and BMMC-treated animals. Values expressed as the mean \pm SEM. In all cases $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ (each experimental group vs. naïve rats) and $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, $\#\#\#p < 0.001$ (comparison between experimental groups). **Lower plate. Examples of nerves used for the quantification of semithin sections.** A, B: Control nerve and ipsilateral proximal segment of a nerve from a non-treated rat, respectively. C, D: Crush area of ipsilateral nerves from CMMO non-treated (NT) and treated (T) rats with sciatic nerve crush of 14 days duration, respectively. E, F: Distal area of ipsilateral nerves from CMMO NT and T rats with sciatic nerve crush of 7 days duration, respectively. Scale bar: 20 μm . Arrows show intact axons; arrowheads show irregular axons; asterisks show myelin and axon debris.



C

	3 días		7 días		14 días		21 días		
g-ratio	Control	Lesión Distal	Lesión	Distal	Lesión	Distal	Lesión	Distal	
No tratados	0.69±0.01	0.81±0.04	0.7±0.01	0.75±0.06	0.93±0.03	0.8±0.01	0.89±0.005	0.8±0.01	0.82±0.01
Tratados con CMMO		0.90±0.02	0.81±0.02	0.62±0.03	0.65±0.05	0.67±0.01	0.69±0.06	0.72±0.01	0.74±0.01

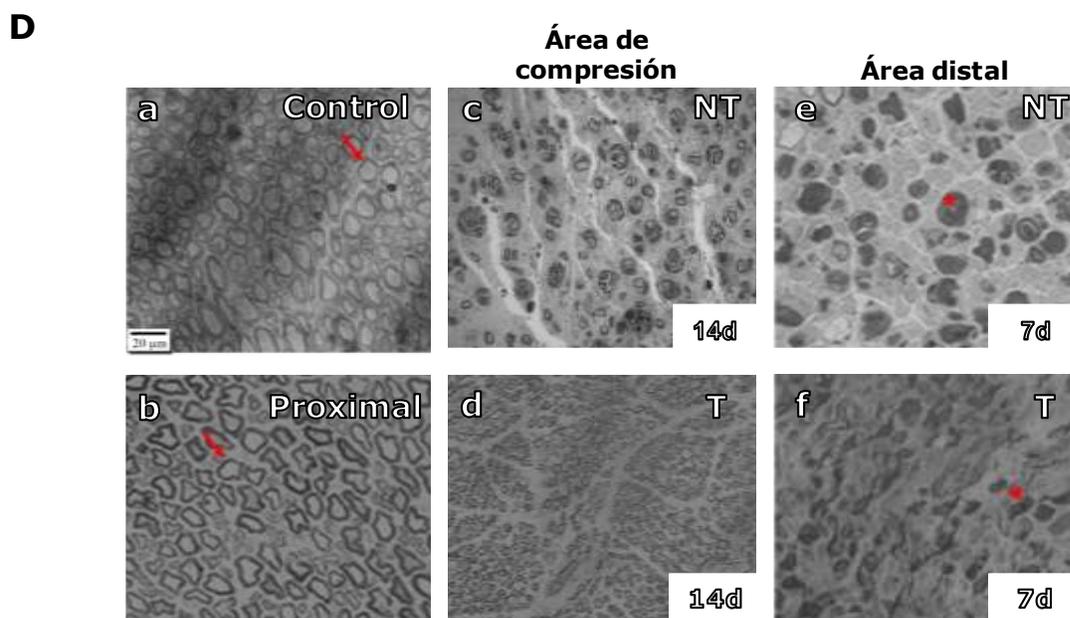


Figura PIV.3 Detección por inmunohistoquímica de la MBP en animales no tratados y tratados con las CMMO a diferentes tiempos de sobrevivencia (n=5, 60X). A, B: Microfotografías de fluorescencia de secciones de nervios contralaterales, y de las áreas proximal y distal de nervios ipsilaterales, luego de la incubación con antisuero de MBP (rojo) y H \ddot{o} chst (en azul para detección de núcleos) 7 y 14 días después de la lesión, respectivamente. Barra de escala: 30 μ m.

Figure PIV.3 Immunohistochemical detection of MBP in non-treated and BMMC-treated animals at different survival times (n=5, 60X). A, B: Fluorescence photomicrographs of sections of Contralateral nerves, and proximal and distal areas of ipsilateral nerves after incubation with MBP antiserum (in red) and H \ddot{o} chst (in blue, for detection of nuclei) at 7 and 14 DPI, respectively. Scale bar: 30 μ m.

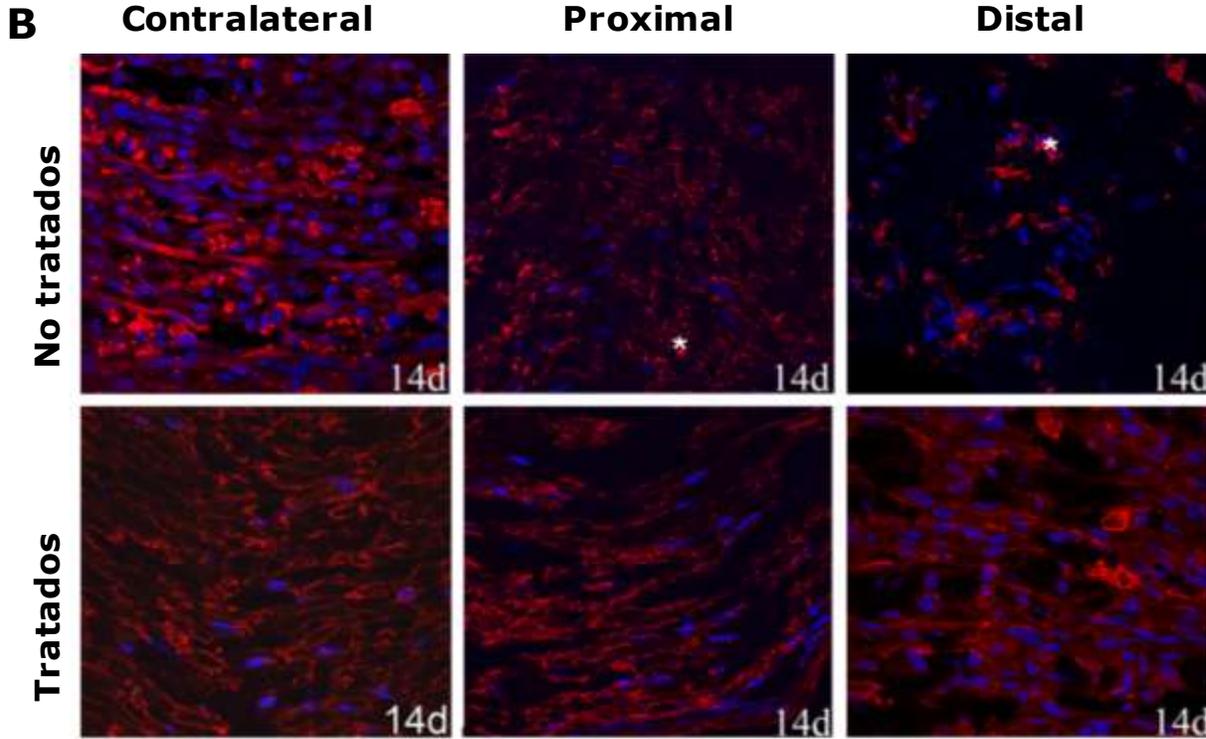
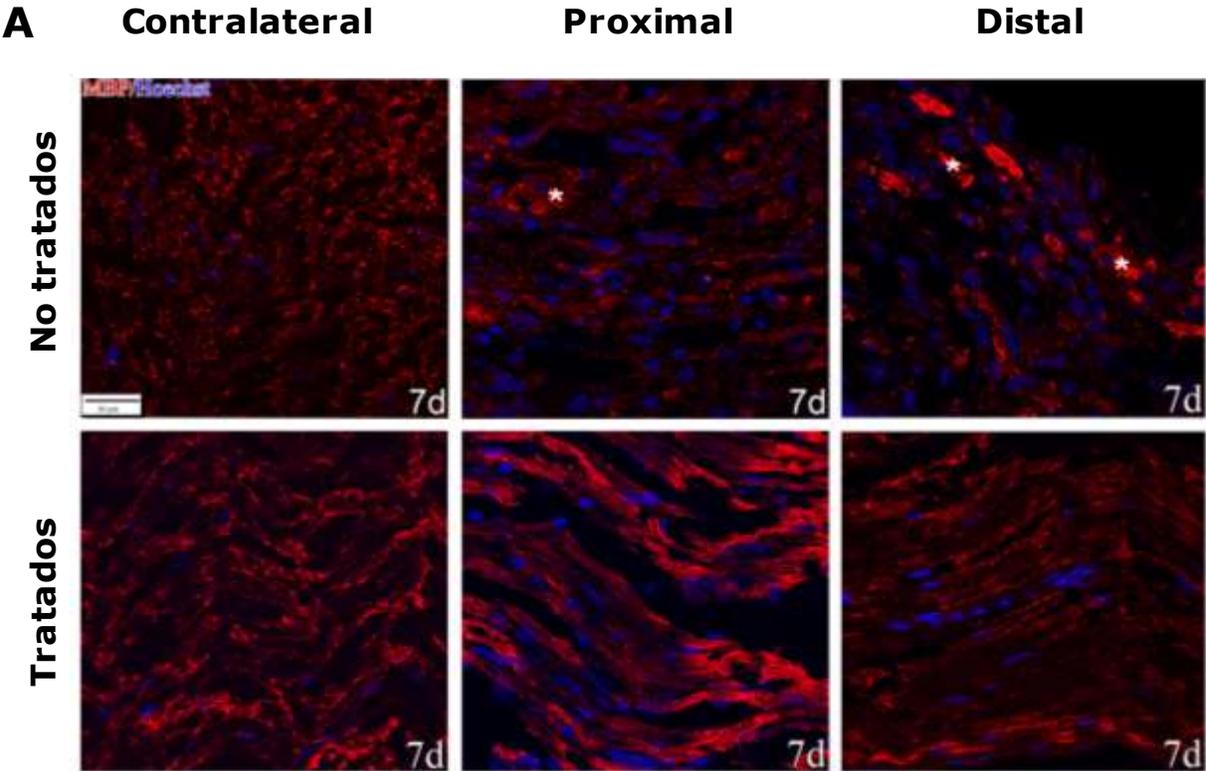


Figura PIV.4 Detección inmunohistoquímica de NF-200 en animales no tratados y tratados con CMMO a diferentes tiempos de sobrevivencia (n=5, 60X). Microfotografías de fluorescencia de secciones de áreas contralaterales y distales de nervios ipsilaterales luego de la incubación con anticuerpos contra NF-200 (rojo) y H \ddot{o} echst (azul para detección de núcleos) 7 y 14 días después de la lesión, respectivamente. Barra de escala: 30 μ m.

Figure PIV.4 Immunohistochemical detection of NF-200 in non-treated and BMMC-treated animals at different survival times (n=5, 60X). Fluorescence photomicrographs of sections of contralateral and distal areas of ipsilateral nerves after incubation with antibodies against NF-200 (red) and H \ddot{o} echst (blue, for detection of nuclei) at 7 and 14 DPI, respectively. Scale bar: 30 μ m.

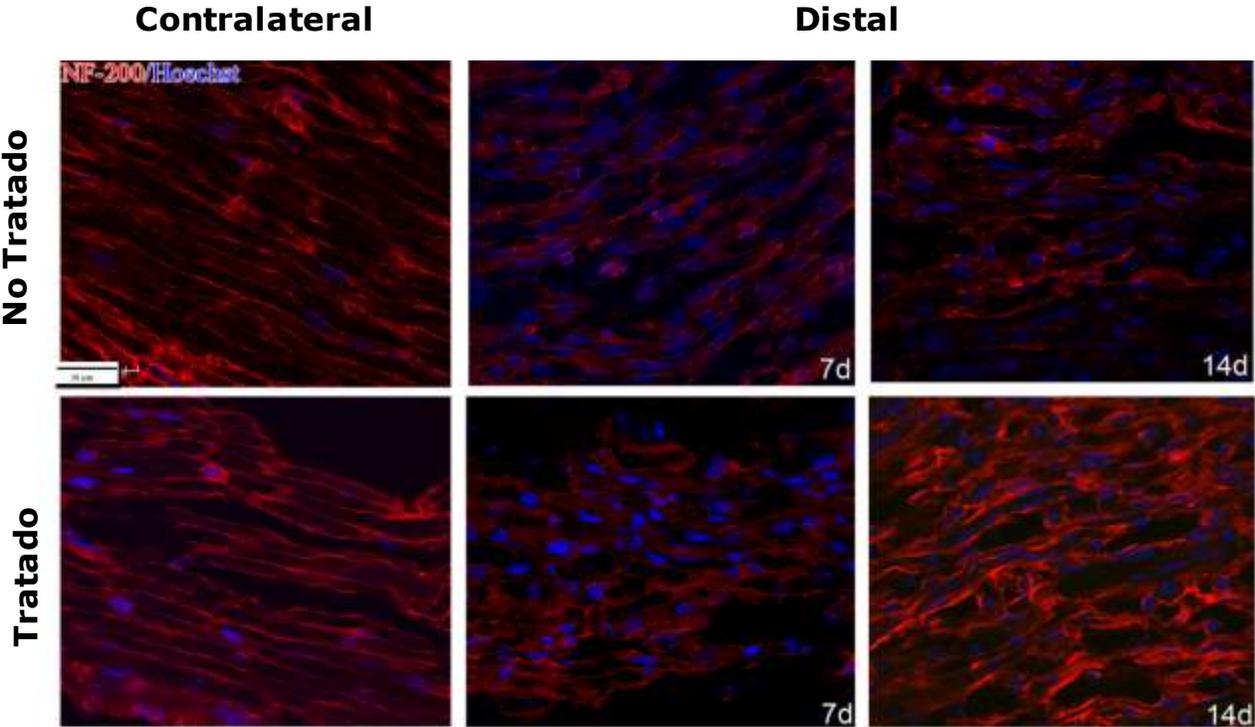


Figura PIV.5 Análisis de la latencia distal y la amplitud del CMAP en ratas control, y en ratas lesionadas no tratadas y tratadas con CMMO a diferentes tiempos de sobrevida (n=6). A: Latencia distal de nervios control e ipsilaterales de animales no-tratados y tratados con CMMO. B: Amplitud del CMAP de nervios control e ipsilaterales de animales no-tratados y tratados con CMMO. Los valores se expresan en promedio \pm error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido del test de Dunnett o un análisis por el t-test; en todos los casos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (cada grupo experimental vs. ratas control) y # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (comparación entre los grupos experimentales).

Figure PIV.5 Analysis of the distal latency and amplitude of the CMAP in naïve, nontreated and BMMC-treated injured rats at different survival times (n=6). A: Distal latency of naïve and ipsilateral nerves in non-treated and BMMC-treated animals. B: Amplitude of CMAP of naïve and ipsilateral nerves in non-treated and BMMC-treated animals. Values expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis performed through ANOVA followed by Dunnett's test or by t-test analysis; in all cases * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (each experimental group vs. naïve rats) and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (comparison between experimental groups).

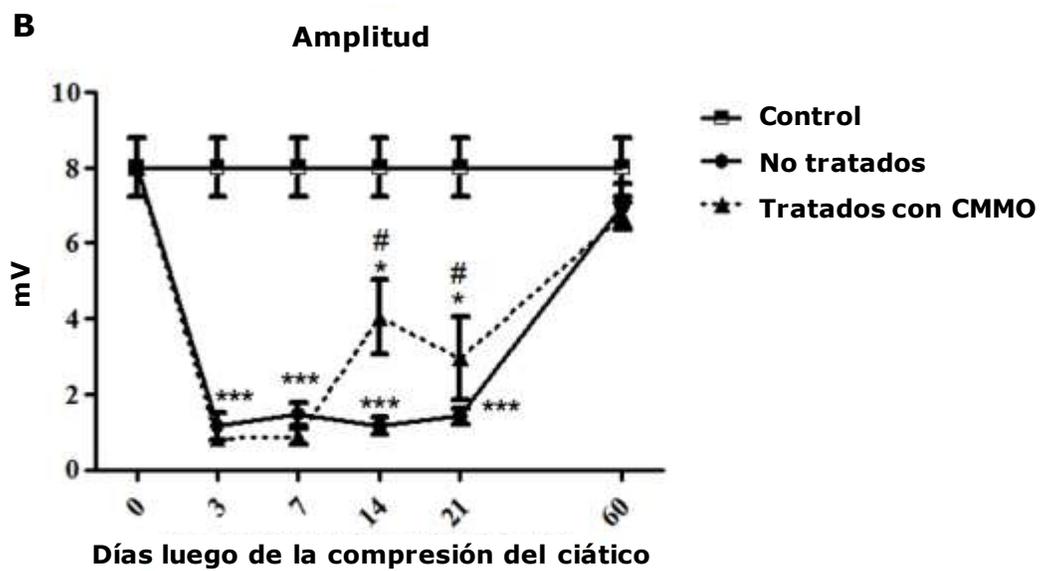
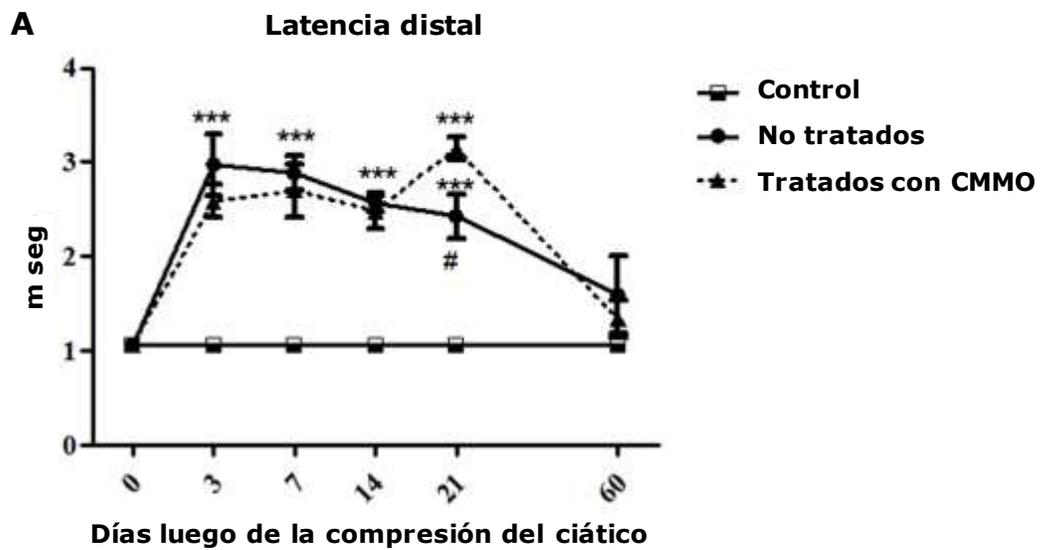
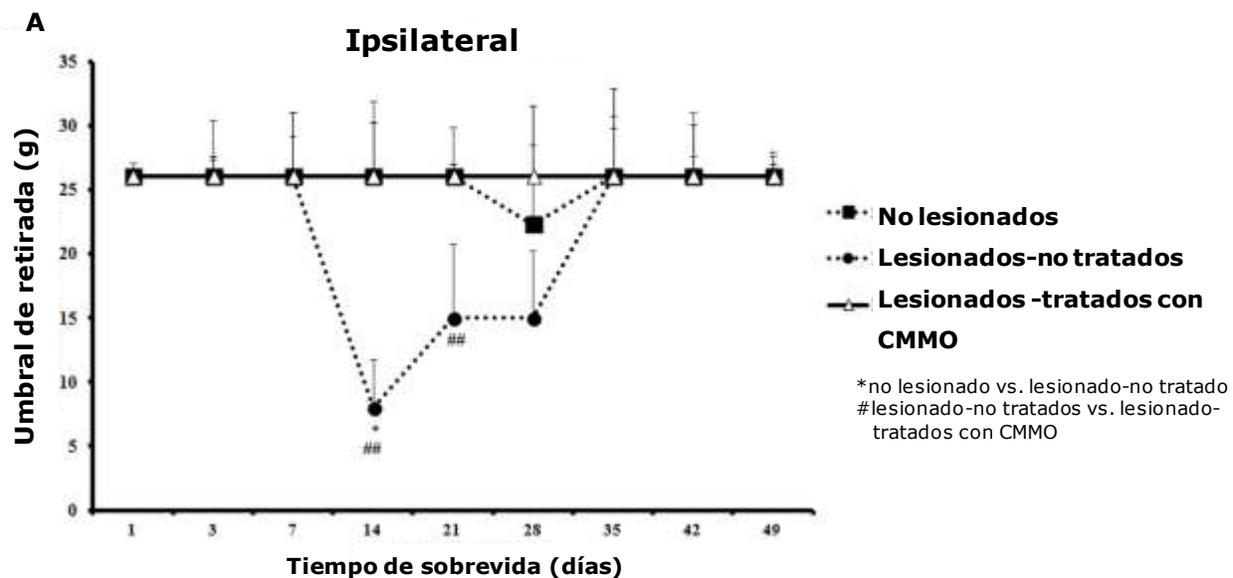


Figura PIV.6 Análisis de la respuesta conductual frente a un estímulo mecánico en ratas no lesionadas, lesionadas no-tratadas y lesionadas tratadas con las CMMO a diferentes tiempos de sobrevida (n = 11). A: Curvas del umbral de retirada en ratas no-lesionadas, y lesionadas tratadas o no-tratadas con CMMO; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparación entre ratas no lesionadas y lesionadas no tratadas; ## $p < 0.01$ comparación entre ratas lesionadas no-tratadas y lesionadas tratadas con CMMO. B: Tabla que muestra la comparación entre las patas contralaterales e ipsilaterales de los tres grupos entre los días 1 y 49 después de la lesión. Las diferencias significativas se indican en negrita * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure PIV.6 Analysis of behavioral responses due to mechanical stimulation in sham, non-treated and BMBC-treated rats at different survival times (n=11). A: Curves showing mechanical withdrawal thresholds in sham, and BMBC non-treated or treated rats; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparison between non-treated and sham rats; ## $p < 0.01$, comparison between BMBC non-treated and treated rats). B: Table showing the comparison between contralateral and ipsilateral paws of the three groups between 1 and 49 DPI. Significant differences are indicated in bold * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.



B

Días	No lesionados		Lesionados-no tratados		Lesionados-tratados con CMMO	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
1	26	26	26	26 ± 1.13	26	26
3	26	26 ± 1.38	26 ± 1	26 ± 4.4	26 ± 1.27	26 ± 1.64
7	26 ± 1.38	26 ± 3.16	26 ± 1	26 ± 5.02	26	26 ± 5
14	26 ± 2.64	26 ± 5.86	26 ± 1.16	8 ± 3.82**	26 ± 1.16	26 ± 4.25
21	26	26 ± 3.9	26 ± 3.19	15 ± 5.82*	26 ± 1	26 ± 1
28	26 ± 1.45	22.3 ± 6.22	26 ± 2	15 ± 5.25**	26 ± 1.52	26 ± 5.55
35	26	26 ± 4.74	26 ± 3	26 ± 3.82	26 ± 2	26 ± 6.82
42	26 ± 1.56	26 ± 1.63	26 ± 1.28	26 ± 5.06	26 ± 0.67	26 ± 4.09
49	26 ± 4.87	26 ± 1.63	26	26 ± 2	26	26 ± 1

Proyecto V. Desarrollo de liposomas multivesiculares para la liberación controlada de fármacos para el tratamiento del dolor.

Obtención de LMVs: puesta a punto de la metodología

Para la obtención de los LMVs, como se detalló anteriormente, se utilizó el método de doble emulsión agua-aceite-agua o w-o-w. Sin embargo, para lograr esta emulsión de manera óptima se tuvieron que poner a punto varios aspectos metodológicos. En primer término, se evaluó la utilización de distintas fuentes de energía mecánica para alcanzar una agitación suficiente para lograr la generación de los LMVs. Se tuvieron en cuenta los métodos utilizados bibliográficamente, que fueron la utilización de un homogeneizador y un vórtex. Los homogeneizadores son utilizados principalmente para romper preparados celulares y alcanzan revoluciones de alrededor de 2×10^4 rpm, mientras que el vortex alcanza apenas 3×10^3 rpm. Al utilizar distintas fuentes de fuerza mecánica se esperaba tener diferencias en cuanto al tamaño de los LMVs, ya que es conocido que el tamaño de las cavidades internas y por lo tanto, el tamaño final del LMV están relacionadas de manera directa a la fuerza mecánica aplicada [335]. Esto último no se observó, sin embargo fue notoria la pérdida de cierta cantidad de muestra utilizando el homogeneizador en comparación al vortex, por lo que se eligió el vórtex para seguir adelante. En la Figura PV.1 se observa la formación de las fases orgánicas y acuosas de la preparación (Figura PV.1A). Se observó que los LMVs quedaban incluidos en gotas de cloroformo procedente de la fase orgánica donde se solubilizan los lípidos (Figura PV.1B y C).

Para eliminar el cloroformo de la emulsión, se pasó una corriente de nitrógeno sobre la superficie de la preparación y se determinó el tiempo necesario para su eliminación. Para esto último, se tomaron muestras a distintos tiempos y luego, bajo observación al microscopio se observó que un tiempo de 15-20 min es

suficiente para la eliminación completa del cloroformo. Una vez optimizados los distintos aspectos de la puesta a punto se obtuvieron LMVs de morfología redondeada, sin cloroformo y de tamaño homogéneo de aproximadamente 20-40 μm (Figura PV.2).

Ensayos de liberación de drogas patrones: Bodipy y Rojo Ponceau-S

A fin de lograr una caracterización del sistema en cuanto a su cinética de liberación, se utilizaron colorantes fácilmente identificables mediante técnicas espectrofotométrica y fluorométricas. En los primeros ensayos, se utilizó Bodipy, que es un fluoróforo de una coloración verde intensa, que se utiliza por ejemplo para estudiar fusión, lisis y unión celular tipo gap. En nuestro caso, lo utilizamos para caracterizar en primera instancia la cinética de liberación. Las muestras de los LMVs conteniendo Bodipy fueron alojadas en un incubador a 37 °C, a 50 rpm, durante 14 días, tomándose muestras e imágenes a distintos tiempos. Así, se observó encapsulamiento de Bodipy dentro de los LMVs (Figura PV.3A y B), aunque por motivos de resolución y técnica de visualización, no fue posible observar las cavidades internas (Figura PV.3C). Como se mencionó anteriormente, se estudió la liberación del Bodipy al medio durante un período de 14 días. En la Figura PV.4 se muestra el perfil de liberación de este compuesto, observándose una caída de la fluorescencia a las 100 horas. Observaciones por microscopía de los LMVs a las 300 hs (Figura PV.5A, B) muestran una morfología no redondeada, que indica degradación del sistema, pero donde aún se observa Bodipy en el interior, lo cual no se correlacionó con el perfil de liberación. Nuestra hipótesis es que la disminución de la emisión de fluorescencia se debe al proceso conocido como self-quenching,

condición en la cual hay una concentración límite a partir de la cual la fluorescencia comienza a disminuir a pesar de que el número de moléculas aumente en el contexto de un volumen pequeño o limitado.

Para resolver la discrepancia observada con el uso de Bodipy, optamos por el uso de un método espectrofotométrico que permitiera cuantificar la liberación acumulada de un compuesto. Se eligió el rojo Ponceau-S, que como su nombre indica, posee una coloración roja que absorbe a un máximo de 510 nm. La utilización del rojo Ponceau-S presentó varias ventajas, principalmente el fácil manejo y el bajo costo. Se obtuvieron imágenes por microscopía que permitieron observar las cavidades de los LMVs y su estructura (Figura PV.5C, D). Seguidamente, se procedió con la realización de ensayos de liberación a 37°C y los ensayos de estabilidad dejando las muestras a 4°C. Para ambos ensayos se encapsuló 2 mg de rojo Ponceau-S. En el primer ensayo de liberación, se logró una encapsulación del $60 \pm 3\%$ del total colorante, y su liberación fue realizada a temperatura ambiente sin agitación. Esta liberación fue satisfactoria hasta las 320 hs, liberando aproximadamente un $66 \pm 5\%$ del rojo Ponceau-S encapsulado (Tabla PV.1). En la Figura PV.6A se detalla el perfil de liberación de rojo Ponceau-S a 37°C y en la Figura PV.6B se muestra la estabilidad de los liposomas a 4 °C.

Encapsulación de morfina y curvas de liberación

En primer término se realizó una curva de calibración de morfina en función de la concentración, midiendo su absorbancia a 285 nm. Se obtuvo una curva con un coeficiente de R² de 0,9998, como se muestra en la Figura PV.7A. Utilizando una solución de morfina de 10 mg (5mg/ml), se logró la encapsulación de 43% de la

droga en los LMV. La cuantificación de la liberación de morfina por un período de 7 días, mostró una liberación acumulada del 34%, que no alcanzó la zona de plateau (Figura PV.7B). En cuanto al ensayo de estabilidad, se calculó la liberación acumulada del LMVs a 4°C y se observó una liberación sólo del $4 \pm 1\%$ de la droga encapsulada a las 168 hs de almacenamiento. La cinética de liberación de los LMVs puede ser ajustada a una ecuación de primer orden $\ln(1-Q) = -k t$, o al modelo de Higuchi $Q = k t^{1/2}$, o Hixon-Crowell $(1-Q)^{1/3} = -k t$, donde para todos los casos Q es el porcentaje de liberación acumulado, t es el tiempo y k la constante de cinética para cada modelo. Las curvas de liberaciones de los LMVs conteniendo morfina fueron ajustadas a estos modelos obteniéndose un R de correlación de 0,978 para la ecuación de primer orden, un R de 0,941 para el modelo de Higuchi y un R de 0,9802 para el modelo de Hixon Crowell, con lo cual en todos estos modelos pueden representar la cinética de liberación de nuestros LMVs. La liberación de droga de los LMVs puede ocurrir no solo mediante difusión sino que también puede ocurrir por un efecto erosivo de las paredes de los LMVs y reordenamiento de las cavidades internas. El modelo de Rigtar Peppas contempla el mecanismo de liberación. Este modelo se describe con la ecuación $\ln Q = C + kt$ donde Q es la fracción de liberación, k y C la pendiente y la ordenada al origen de la curva entre $\ln Q$ y $\ln t$ respectivamente. Si $k \geq 0,89$ la liberación ocurrió por difusión, si $k \leq 0,45$ la liberación se explica por de erosión, y si k se encuentra entre estos valores la liberación es producto de ambos procesos. En nuestro caso, para los LMVs conteniendo morfina se obtuvo un k de 0,66 por lo que se puede decir que la liberación ocurrió por ambos mecanismos.

Figura PV.1. A: Fases acuosa (+) (Bodipy) y orgánica (*) (lípidos en cloroformo) del preparado para la formación de LMVs. B: LMV inmerso en una gota de cloroformo. C: LMV sin cloroformo.

Figure PV.1. A: Liquid (+) (Bodipy) and organic (*) (lipids in cloroform) phases of the mixture for the preparation of the multivesicular liposomes (MVLs). B: A MVL immersed in a drop of cloroform. C: A MVL without cloroform.

A



B



C

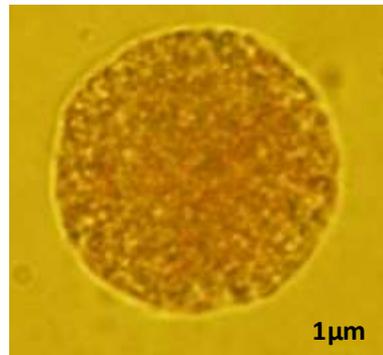


Figura PV.2. Liposomas multivesiculares observados con diferentes aumentos; A: 10X y B: 40X. Las flechas indican los LMVs sintetizados.

Figure PV.2. Multivesicular liposomes observed with different magnifications; A: 10X y B: 40X. The arrows indicate the multivesicular liposomes that were produced.

A



B

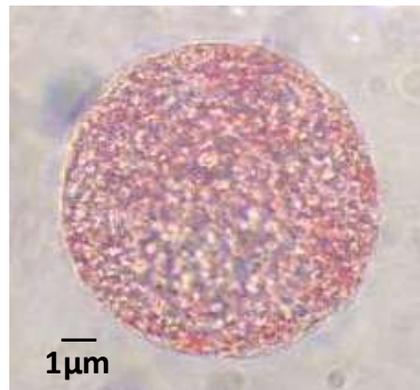


Figura PV.3 Imágenes de los LMVs A: sin y B: con filtro de fluorescencia. C: Detalle de un LMV con *Bodipy*.

Figure PV.3 Images of the MVLs A: without and B: with a fluorescence filter. C: Details of a MVL with *Bodipy*.

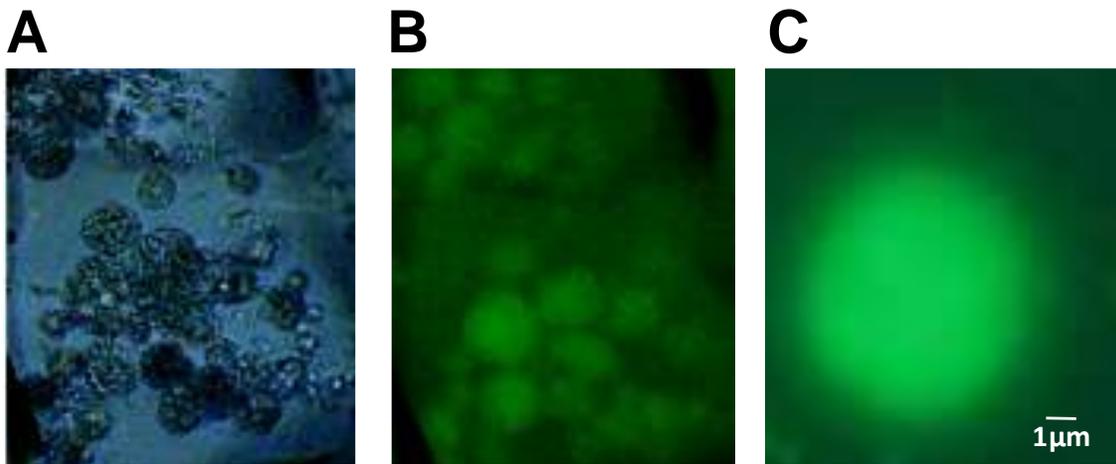


Figura PV.4 Perfil de liberación del *Bodipy* durante 14 días.

Figure PV.4 Release profile of the *Bodipy* during 14 days.

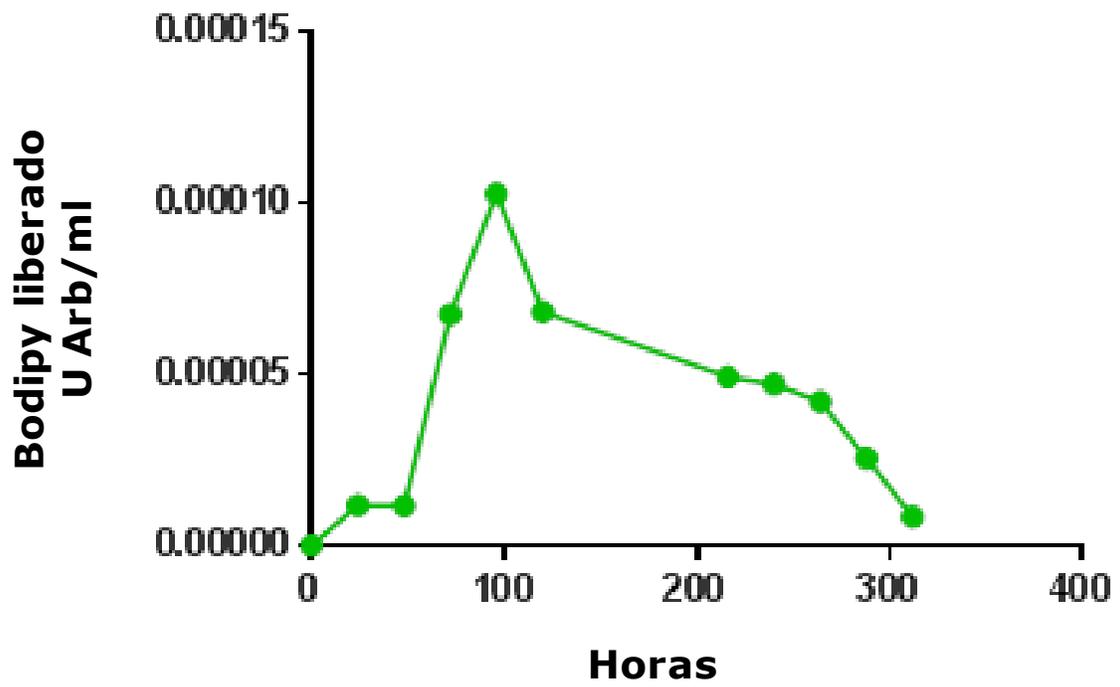


Figura PV.5 LMVs con *Bodipy* encapsulado a las 100h, observado a un aumento de 40X
A: con y B: sin filtro fluorescente. C: LMVs encapsulando rojo Ponceau-S observado a un aumento de 25X. D: Detalle de un LMV observado a un aumento de 60X. Las flechas indican los LMVs.

Figure PV.5 MVLs with *Bodipy* encapsulated at 100 hours, observed with a 40x magnification A: with and B: without a fluorescence filter. C: MVLs encapsulating Ponceau-S red stain, observed with a 25x magnification. D: Details of a MVL observed with a 60x magnification. Arrows indicate MVLs.

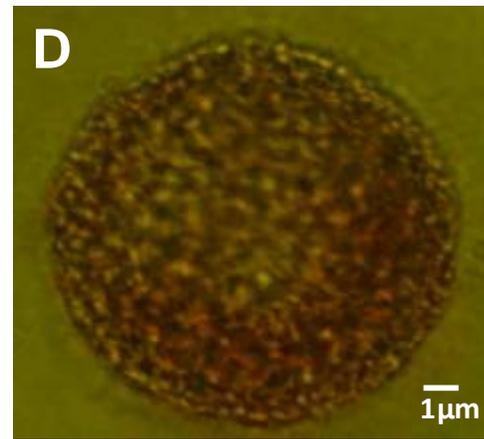
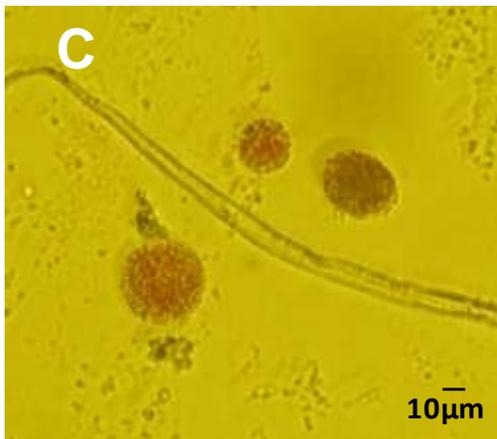
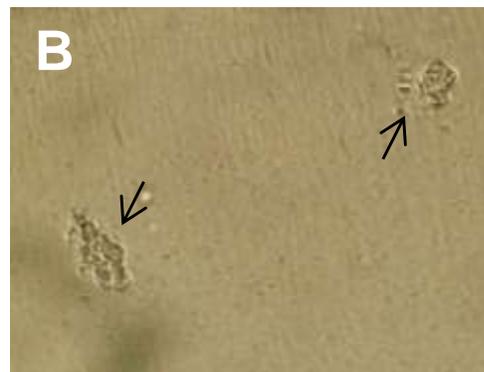
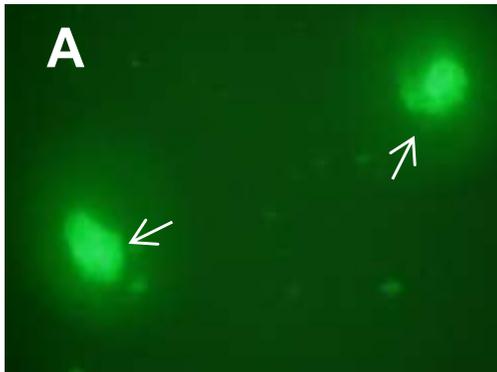


Tabla PV.1. Liberación acumulada de rojo Ponceau-S.

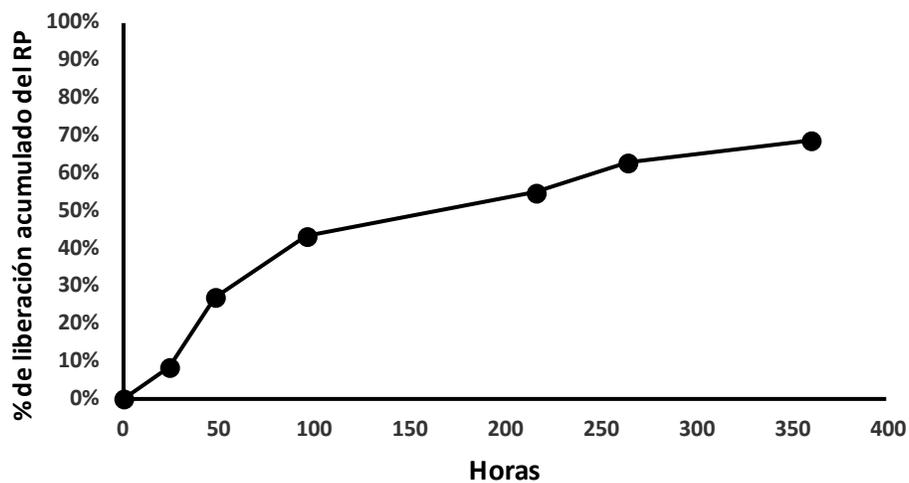
Table PV.1. Accumulated release of the Ponceau-S red stain.

Horas	mg liberados	% acumulado
0	0,055	5%
24	0,100	8%
48	0,320	27%
96	0,506	42%
216	0,637	53%
264	0,727	61%
360	0,793	66%

Figura PV.6. A: Perfil de liberación rojo Ponceau-S (RP) a 37°C. B: Ensayo de estabilidad de LMVs con rojo Ponceau-S a 4°C.

Figure PV.6. A: Release profile of the Ponceau-S red stain (RP) at 37°C. B: Stability test with Ponceau-S red stain MVLs at 4°C.

A



B

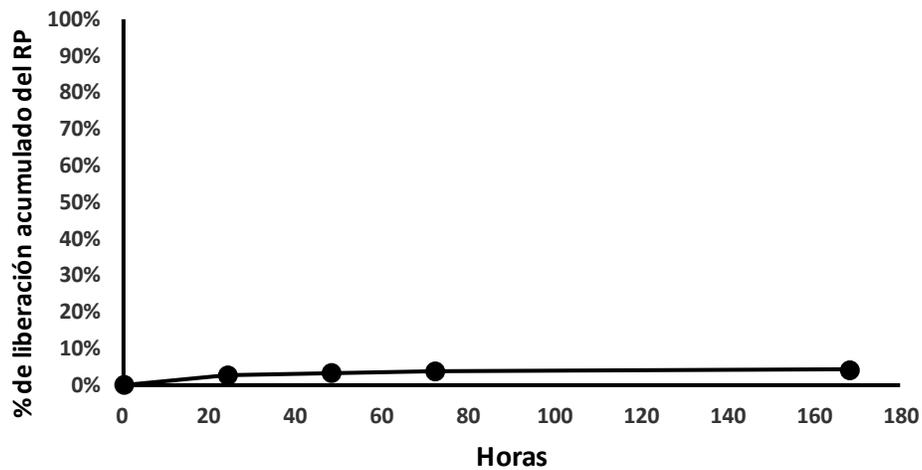
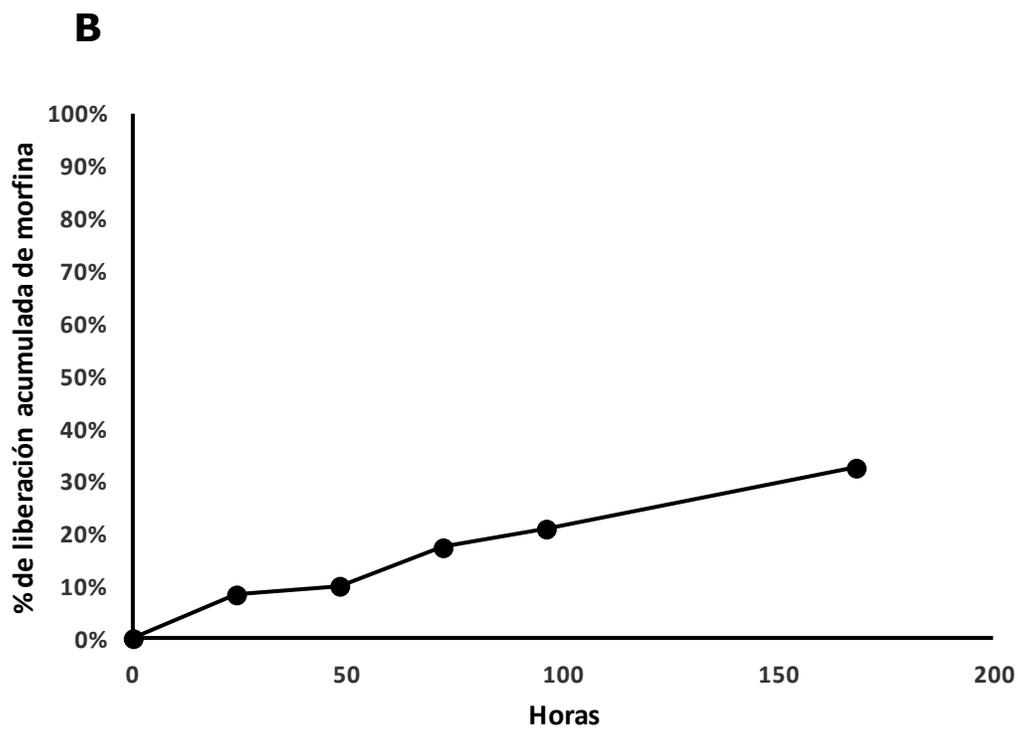
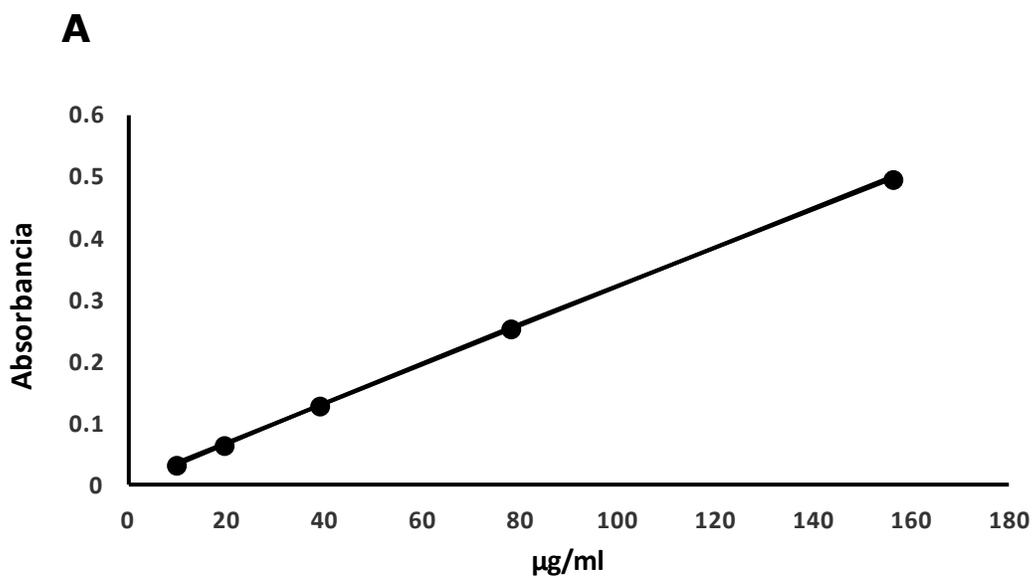


Figura PV.7. A: Curva de calibración de morfina. B: Curva de liberación de la morfina a 37°C con agitación.

Figure PV.7. A: Morphine calibration curve. B: Morphine release curve at 37°C with agitation.



DISCUSIÓN

La Discusión de los resultados presentados en la presente tesis doctoral será dividida en 4 secciones:

- **Consideraciones Metodológicas** (Proyectos II-IV).
- **VGLUTs, neuronas aferentes primarias y espinales, y dolor** (Proyecto I).
- **Lesión de nervios periféricos mixtos, viscerales y no-viscerales, y correlación con dolor** (Proyecto II).
- **Análisis experimental de estrategias terapéuticas farmacológicas, celulares y nanotecnológicas contra el dolor crónico** (Proyectos III-V).

Consideraciones Metodológicas

Antes de pasar a discutir los resultados de la presente tesis, es conveniente mencionar algunos aspectos metodológicos relevantes.

En el Proyecto II, utilizamos **DAPI para identificar los núcleos de las células presentes en cada sección de tejido**. Usualmente, el DAPI es utilizado para la marcación nuclear en protocolos de inmunofluorescencia, mientras que en la inmunohistoquímica con identificación cromogénica, suelen utilizarse marcadores nucleares como la hematoxilina. Sin embargo, la marca cromogénica que se obtiene puede ocupar la totalidad de las áreas citoplasmáticas y nucleares, impidiendo la visualización de los núcleos marcadas con hematoxilina. Por ello, en el Proyecto II introdujimos una técnica novedosa que permite la visualización de núcleos fluorescentes marcados con DAPI, así como de las células identificadas con el marcador de interés. Esto permitió la cuantificación de los núcleos del total de neuronas presentes en cada sección usando la señal fluorescente de DAPI, seguido de la cuantificación de las neuronas nucleadas positivas para cada marcador de interés usando la señal cromogénica. Según creemos, esta es la primera vez que se utiliza este método.

Asimismo, y también para el Proyecto II, es conveniente abordar el tema de la **muerte neuronal luego de la axotomía de nervios periféricos**. Estudios neuroesterológicos previos que comparan ratones control y ratones con axotomía han reportado que mas del 20% de todos las neuronas de los GARDs L4-L5 se pierden luego de los 7 días ocurrida la lesión [359]. Curiosamente, la proximidad del sitio de lesión al GARD y la muerte neuronal parecen estar directamente relacionadas. Así, ratas con axotomía del nervio ciático a nivel de la mitad del muslo no ocasiona el mismo grado de pérdida neuronal en los GARDs L5 [360], que

cuando la lesión ocurre a 7 mm de distancia del ganglio [361]. En el presente trabajo de tesis, se realizó la axotomía del nervio pélvico por lesión de las ramas ventrales de L6 y S1, cercana a su salida desde el foramen intravertebral. De este modo, podría ser posible que ocurrieran muerte neural o atrofia severa luego de la lesión, y esto afectara el número absoluto de neuronas de los GARDs, y por ende la cuantificación presentada en la sección Resultados. Sin embargo, el foco de nuestro estudio no fue demostrar muerte neuronal luego de la axotomía del nervio pélvico ni su concurrencia sobre los valores absolutos. Por lo tanto, todos los resultados y la consiguiente discusión deberán ser abordados desde el punto de vista de cambios relativos en la expresión de ciertos marcadores neuroquímicos.

En los Proyectos III y IV, fueron usados dos **métodos diferentes de evaluación de alodinia mecánica**: Evaluación del umbral del 50% [348] y Test de von Frey ascendente (ver Brumovsky et al., 2004) (ambos descriptos detalladamente en la sección *Materiales y métodos* y ampliamente utilizados en la literatura). Si bien ambos métodos son aceptados actualmente como válidos para la evaluación de alodinia mecánica, optamos por utilizar la evaluación del umbral del 50% en el Proyecto III. Esto es así, porque en este proyecto fue necesario evaluar la conducta del animal cada 5, 10 o 15 minutos. Si hubiéramos utilizado el método de von Frey ascendente, en dónde es necesario repetir la estimulación un mínimo de dos veces con un descanso de 5 minutos entre estímulos, la evaluación en los primeros 15 minutos de aplicación del agonista del Y1R en el Proyecto III no hubiera sido posible.

Finalmente, en el Proyecto III, introdujimos una **modificación al test de alodinia al frío de Choi** por motivos similares a los descriptos anteriormente con

la evaluación de la alodinia mecánica. En el test de Choi tradicional [351] se realiza 1 estimulación con una gota de acetona cada 5 minutos, hasta alcanzar un valor total de 5 estimulaciones (25 minutos para la obtención de un resultado). Para la realización del Proyecto III, nosotros adaptamos esta metodología (descrita detalladamente en la sección *Materiales y métodos*) para lograr obtener los datos de la conducta frente a un estímulo frío cada 16 minutos, dado que era necesaria la evaluación del efecto del agonista del Y1R en ese período de tiempo. Para asegurarnos que esta modificación de protocolo arrojaría resultados confiables, realizamos una serie de experimentos preliminares en animales con LCC, analizando la validez de las siguientes estrategias: a) 3 iteraciones cada 5 minutos, b) 4 iteraciones cada 4 minutos, c) 5 iteraciones cada 3 minutos, d) 5 iteraciones cada 4 minutos y e) 5 iteraciones cada 5 minutos (protocolo original). Observamos que sólo el protocolo **b** arrojó resultados comparables con el protocolo original. El resto de los protocolos mostraron datos aleatorios compatibles con poca fiabilidad (datos no mostrados). Basándonos en esto, decidimos utilizar el protocolo de 4 iteraciones cada 4 minutos.

Habiendo descrito estas salvedades metodológicas, procederemos con la discusión de los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral.

VGLUTs, neuronas aferentes primarias y espinales, y dolor

Proyecto I. Expresión del transcripto de los transportadores vesiculares de glutamato en ganglios anexos a la raíz dorsal lumbares y médula espinal de ratón – Efectos de la axotomía periférica o la inflamación de la pata trasera

Expresión del transcripto de los VGLUTs en los GARDs del ratón

En el primer análisis sobre la expresión del VGLUT1 por hibridación *in situ* en los GARDs L4–5 de la rata, Oliveira y cols.[101] comunicaron que “...Muchas neuronas fueron positivas para el ARNm del VGLUT1 y eran principalmente de tamaño grande...”, aunque en ese momento no se realizó una cuantificación formal. En el ganglio trigémino de la rata, se detectaron alrededor de un 80% de neuronas IR para el VGLUT1 [362]. Landry y cols. (2004), comunicaron que la mayoría de las neuronas de los GARDs L4–5 de la rata expresan el transcripto del VGLUT1 [363]. Unos años más tarde, Morris y cols. (2005), comunicaron en los GARDs L4–5 del ratón alrededor de un 37% de neuronas VGLUT1-IR, un porcentaje comparable con el ~32% de neuronas VGLUT1-IR que se proyectan a la vejiga urinaria del ratón [364, 365]. En el presente trabajo de tesis realizado en ratón, mostramos que alrededor de un 45% de las neuronas ubicadas en los GARDs L4–5 de mediano y gran tamaño expresan ARNm para VGLUT1. Sin embargo, en otros estudios inmunohistoquímicos realizados en ratón, se detectó que solo un ~11% de las neuronas de los GARDs expresaban VGLUT1 [366], similar al porcentaje de neuronas VGLUT1 positivas halladas en los GARDs que se proyectan al colorrecto 12%; [367]. Las diferencias observadas en el número de neuronas que expresan la proteína del VGLUT1 según el nivel del GARD pueden ser debidas a la regulación diferencial de genes y proteínas. Más difícil de explicar son las diferencias que se

observan entre trabajos que describen la expresión de las proteínas y los transcriptos del VGLUT1. Sin embargo, es posible que las mismas estén relacionadas con el hecho de utilizar diversos tipos de anticuerpos y sondas para el VGLUT1, o al empleo de técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* distintas, e inclusive diferentes cepas de ratones. Alternativamente, se podría especular que no todos los transcriptos del VGLUT1 son traducidos a proteínas, lo cual sugiere que podrían existir distintos mecanismos de regulación.

En el presente trabajo de tesis encontramos que el ARNm del VGLUT2 es expresado en alrededor de un 69% de las neuronas localizadas en los GARDs L4–5 del ratón. Este dato es consistente con porcentajes obtenidos en estudios recientes (~82%; [368]). Asimismo, en un estudio previo realizado en ratón, encontramos que la proteína del VGLUT2 está presente en alrededor de un 65% de las neuronas de los GARDs L4–5 [366]. También se ha demostrado una presencia aún más abundante de PNs que expresan el VGLUT2 en los GARDs de ratón (~90%; [368]), en el ganglio trigémino de la rata (~80%; [362]) y en neuronas de los GARDs viscerales del ratón, en donde más de un 90% de los PNs que proyectan a la vejiga urinaria [364] y hasta un 98% de las que se dirigen hacia el colorrecto [367] expresan el VGLUT2. Las neuronas de los GARDs que expresan VGLUT2 abarcan todos los tamaños celulares, aunque muchas de ellas son de pequeño y mediano tamaño [364, 366, 367], presente tesis). Por ende, la gran cantidad del VGLUT2 que se observa en diversas poblaciones neuronales sensitivas periféricas apoya la hipótesis de que este es el principal VGLUT en neuronas de los GARDs, y de su probable importancia en la neurotransmisión glutamatérgica.

El transcripto del VGLUT3 fue detectado en alrededor de un 17% de los PNs de los GARDs L4–5 del ratón. Este pequeño porcentaje coincide con estudios realizados en ratones transgénicos [187, 369]. También, Seal y cols. (2009), observaron que entre un 10 – 11% de las neuronas de los GARDs L4–5 o del ganglio trigeminal en ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente amplificada bajo el control del promotor del VGLUT3 [187]. En un estudio más reciente, y utilizando al gen reportero *Tomato*, se observó que alrededor de un 19% de las neuronas pequeñas de los GARDs L4–5 de ratón expresan el VGLUT3 [369]. Curiosamente, estos autores también mostraron una expresión del VGLUT3 transitoria vs. persistente. Así, este transportador se halló en neuronas mielinizadas de mediano y gran tamaño de los GARDs durante períodos prenatales, disminuyendo en períodos neonatales y manteniéndose sólo en las poblaciones neuronales de tamaño pequeño en etapas adultas [369]. En la presente tesis, no sólo observamos el ARNm del VGLUT3 en neuronas de tamaño pequeño sino también en PNs de neuronas de los GARDs de mediano tamaño. Queda por establecerse si lo último refleja algún grado de persistencia en la expresión del VGLUT3 (transcripto y/o proteína) desde períodos prenatales. Finalmente, los GARDs viscerales que se proyectan al colorrecto [367] o la vejiga urinaria [364] del ratón también presentan un bajo porcentaje de neuronas de pequeño tamaño que expresan el VGLUT3 (~10% y ~18% respectivamente).

La abundancia del VGLUT2 por sobre los otros dos VGLUTs implica que existe un cierto grado de coexistencia. Este concepto fue en un principio rechazado [165, 173, 370], pero luego comenzó a aceptarse tanto para neuronas del SNC [371, 372] como del SNP [363, 366, 373]. De hecho, se ha mostrado la coexistencia de

VGLUT1 y VGLUT2 en neurons del ganglio trigémino [362] y de los GARDs L4–5 de la rata [363] o el ratón [366]. Asimismo, hemos demostrado recientemente la coexistencia del VGLUT2 y el VGLUT3 en los GARDs L4–5 [364]. Por otra parte, la fuerte expresión del VGLUT2 observada en neuronas de los GARDs que proyectan al colorrecto [367] y la vejiga urinaria [364] del ratón apoya fuertemente el concepto de que hay coexpresión con otros VGLUTs en neuronas viscerales.

Se ha sugerido que la expresión de los VGLUTs puede que esté asociada con diferentes patrones de liberación de neurotransmisores. Asimismo, el VGLUT1 normalmente se expresa en neuronas del SNC con una baja probabilidad de liberación (fibras trepadoras del cerebelo), mientras que el VGLUT2 se asociaría a aquellas con una alta probabilidad de liberación (fibras paralelas del cerebelo) [374]. Serán necesarios más estudios para determinar en qué medida se puede asociar el tipo de VGLUT con la probabilidad de liberación en neuronas de los GARDs. Una pregunta interesante sería cual es el significado de la presencia de más de un VGLUT en neuronas de los GARDs con respecto a la liberación de glutamato.

Expresión del transcritto de los VGLUTs en la médula espinal del ratón

En el presente proyecto de tesis realizado en ratones adultos observamos una distribución diferencial de los transcritos de VGLUTs en neuronas de la médula espinal, confirmando estudios previos realizados en rata [101, 363, 375] y ratones neonatales [369, 376]. Cada uno de los VGLUTs mostró una distribución diferente a lo largo de las láminas y segmentos analizados de la médula espinal. El VGLUT1 se observó casi exclusivamente en la médula espinal toracolumbar, en una

subpoblación de neuronas localizadas en la región dorsomedial de la zona intermedia del asta dorsal (láminas IV – V). Curiosamente, esta área es conocida por presentar el núcleo dorsal de Clarke. Allí se originan las vías espinocerebelosas [377]. Se observó otro grupo de neuronas positivas para el ARNm del VGLUT1 en la región medial del asta dorsal profunda (láminas III – IV). Otras neuronas, incluyendo las motoneuronas o neuronas ubicadas en el asta dorsal superficial, no presentaron expresión del VGLUT1. En cambio, en la rata se observaron neuronas positivas para el ARNm del VGLUT1 en la lámina I del asta dorsal, así como también en lo que parecieran ser motoneuronas [363]. La discrepancia quizás se deba, nuevamente, al uso de diferentes cepas de roedores, técnicas de hibridización *in situ* o ribosondas.

Además de la presencia en neuronas de la médula espinal, es posible observar neuropilo inmunoreactivo para VGLUT1 en las astas dorsales y ventrales, en cantidades abundantes y sensible a la rizotomía dorsal [101, 127, 366, 375, 378]. Una gran proporción de estas fibras son contribuidas por neuronas de mediano y gran tamaño de los GARDs que expresan el VGLUT1, a las que se ha atribuido participación en funciones propioceptivas y en la regulación de la función motora [101, 108, 127, 363, 366, 375, 376]. Una evidencia fehaciente de su rol propioceptivo es la identificación de colocalización del VGLUT1 con parvalbúmina (marcador de propioceptores musculares y conocido por participar en el contacto entre neuronas aferentes primarias y motoneuronas) en numerosas fibras localizadas en el asta ventral (ver [127, 378]). También cabe destacar que las células piramidales de la neocorteza expresan el ARNm del VGLUT1 [165] y que numerosas fibras nerviosas del tracto corticoespinal de la rata que terminan en el

asta ventral presentan inmunoreactividad para el VGLUT1 [139, 379]. Esto implicaría la participación del glutamato no sólo en la propiocepción (aferecia primaria) sino también en el control supraespinal y cortical de las motoneuronas.

La inmunoreactividad para el VGLUT1 también es observada en receptores mecánicos musculares y cutáneos de bajo umbral, cuyas terminaciones centrales terminan en regiones superficiales y profundas del asta dorsal [108, 127, 378]. Es interesante observar la presencia de abundantes fibras aferentes primarias inmunoreactivas para el VGLUT1 que parecieran terminar en el área que ocupa el núcleo dorsal de Clarke [101, 127, 366], el cual contiene neuronas de segundo orden que dan origen a las vías espinocerebelosas [377]. Si estas fibras aferentes primarias realizaran sinapsis con las neuronas del núcleo dorsal de Clarke, y éstas últimas fueran en efecto inmunoreactivas para el VGLUT1, se podría hipotetizar que las vías propioceptivas espinocerebelosas utilizan VGLUT1 y glutamato para la transmisión de información propioceptiva al cerebelo. Apoyando este concepto, se han observado abundantes fibras inmunoreactivas para el VGLUT1 terminando en regiones anteriores y posteriores del cerebelo [380], siendo estas regiones conocidas por recibir aferencias provenientes de fibras musgosas espinocerebelosas (ver [381]).

A diferencia del VGLUT1, el VGLUT2 presenta un patrón de expresión muy amplio, el cual no sólo se observa en prácticamente todas las láminas de las astas ventral y dorsal, sino también a lo largo de todos los segmentos medulares analizados (toracolumbar a lumbosacro). Nuestros presentes datos confirman estudios previos sobre la síntesis y la abundancia del VGLUT2 en neuronas de la médula espinal realizados en rata [101, 108, 375] y en ratones neonatales [376].

También observamos una señal difusa del ARNm del VGLUT2 en las láminas II – III, aunque siempre pareció estar asociada con somas neuronales. Al respecto, se ha sugerido que un tipo similar de señal en la médula espinal de rata correlacionaría con el pequeño tamaño de las neuronas presentes en tales láminas, así como a los niveles posiblemente bajos del transcrito [101]. La virtual ausencia del VGLUT2 en la lámina IX, especialmente observada en el ensanchamiento lumbar, junto con la ausencia del VGLUT1 (y el VGLUT3), sugiere que las motoneuronas y otras interneuronas localizadas en esta lámina, y sobre todo en este segmento medular, no sintetizan glutamato [101, 375, 376]. Quedaría por establecer si las motoneuronas, que expresan otros marcadores glutamatérgicos como el glutamato en sí mismo [382, 383], y/o el transportador de aminoácidos excitatorios tipo 3 asociado a la membrana plasmática neuronal [382], utilizan un tipo de VGLUT aún no descrito.

La abundancia y la distribución del VGLUT2 en neuronas de la médula espinal de la rata [101, 376] [108, 363, 375] y el ratón (presente trabajo) sugieren que se expresa tanto en interneuronas [101, 108] como en neuronas de proyección. De hecho, los análisis inmunohistoquímicos de las terminaciones nerviosas de las interneuronas de la médula espinal de la rata muestran que muchas de las terminales que expresan somatostatina, neurotensina, sustancia P y/o encefalina, también expresan el VGLUT2 [108]. Otras evidencias que avalan este concepto provienen de estudios electrofisiológicos realizados en rata, en donde se han identificado interneuronas funcionalmente excitatorias y que a su vez expresan el VGLUT2 [384-386]. Nuestros datos respaldan la existencia de varias poblaciones de interneuronas espinales glutamatérgicas que utilizan el VGLUT2 en el ratón.

Sumado a esto, los estudios que muestran la presencia del VGLUT₂ en las terminales de los lemniscos y las vías espinotalámicas en el núcleo ventroposterolateral del tálamo de la rata [387] sugieren que al menos algunas neuronas que expresan el ARNm para el VGLUT2 en la rata y en el asta dorsal del ratón son neuronas de proyección. Asimismo, la coexpresión del VGLUT1 y el VGLUT2 en las fibras musgosas del cerebelo (ver [380]) sugiere que el núcleo dorsal de Clarke también expresa VGLUT2.

La presencia del VGLUT2 en un abundante número de neuronas de la médula espinal sostiene la idea de que la profusa inmunoreactividad para el VGLUT2 que se observa normalmente en la sustancia gris de la médula espinal de la rata [101, 127, 363, 373] y del ratón [366] depende fuertemente de la producción locales. A favor de esto, se observa que la rizotomía dorsal no reduce la presencia del VGLUT2 en la médula espinal de los roedores [101, 127, 366], revelando sólo una pequeña contribución de neuronas de los GARDs [108, 127]. Sin embargo, la ligadura de la raíz dorsal resulta en una modesta acumulación del VGLUT2 (lado del GARD) en el ratón, implicando que pequeñas cantidades del VGLUT2 son transportadas desde los GARDs a la médula espinal [366]. Sumado a esto, Todd y cols. (2003), reportaron intensidades variables (desde bajas a altas) de inmunoreactividad de VGLUT₂ en fibras aferentes primarias mielínicas y no mielínicas [108]. Entonces, la aparente falta de cambio en la expresión del VGLUT2 luego de la rizotomía dorsal podría ser explicada por el hecho de que a una modesta contribución del VGLUT2 desde neuronas de los GARDs, se opone un fuerte aporte de interneuronas y neuronas de proyección de la médula espinal. Ya previamente se propuso una hipótesis similar

para la expresión del receptor Y1 del neuropéptido tirosina en aferencias primarias de la rata [225].

Gras y cols. (2002), fueron los primeros en reportar, basados en muestras de tejidos procesadas mediante RT-PCR, la presencia del ARNm del VGLUT3 en las astas dorsal y ventral de la médula espinal de la rata [172]. Pero, en estudios que se realizaron posteriormente, se mostró la ausencia de señal del ARNm por hibridación *in situ* [101] sugiriendo que el VGLUT3 no se expresaba en neuronas de la médula espinal de la rata. Esta presunción se fortaleció con otros estudios en ratones transgénicos, donde el VGLUT3-EGFP se mostró virtualmente ausente en la médula espinal [187]. Por el contrario, en otro trabajo realizado en ratas adultas en donde se utilizó hibridación *in situ* con ribosondas no-radioactivas, se visualizó una modesta expresión del VGLUT3 en las láminas profundas del asta dorsal y en el asta ventral [363]. En el presente trabajo de tesis realizado en ratones adultos, observamos que el VGLUT3 es el transportador que menos se expresa, encontrándose presente sólo en algunas neuronas de las láminas III – IV del asta dorsal. Curiosamente, un estudio publicado recientemente demuestra la presencia del transcripto del VGLUT3 en lo que parecieran ser dos poblaciones neuronales, una en la región superficial y otra en las láminas profundas del asta dorsal de ratones neonatos [369]. Es posible que las neuronas que expresan VGLUT3 en la región superficial del asta dorsal pierdan la capacidad de sintetizar el transportador en la vida adulta, y solo un número limitado de neuronas ubicadas en las láminas más profundas permanezcan con capacidad para producir cantidades detectables del transportador. Si el transcripto del VGLUT3 en estas neuronas es traducido a proteína, queda por ser establecido. Sin embargo, se ha reportado la ausencia

virtual de neuronas inmunoreactivas para el VGLUT3-EGFP en ratones transgénicos en donde la expresión de EGFP es regulada por el promotor del VGLUT3; esto se vio acompañado de inmunoreactividad moderada en el neurópilo de la región superficial del asta dorsal positiva para VGLUT3, posiblemente por contribución de las neuronas de los GARDs. Apoyando tal concepto, la rizotomía dorsal abolió por completo la presencia de inmunoreactividad para el VGLUT3-EGFP [187]. Finalmente, también existen fibras nerviosas inmunoreactivas para el VGLUT3 en la columna intermediolateral de la médula espinal tóraca (asiento de las neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático), aunque su coexpresión con serotonina supone un origen supraespinal (ver [101]).

Efectos sobre el transcripto de los VGLUTs luego de la lesión de un nervio periférico o de la inflamación de la superficie plantar de la pata posterior

Se ha propuesto un rol relevante para los VGLUTs, en particular el VGLUT2 [185, 368, 388-390] y el VGLUT3 [187, 369, 391] en los mecanismos del dolor bajo condiciones de lesión de nervios periféricos o inflamación tisular. Ambos tipos de lesión ocasionan un aumento o disminución de numerosas moléculas que se hallan involucradas en las más diversas funciones de las neuronas de los GARDs y los ganglios simpáticos, así como también en motoneuronas de la médula espinal [224, 392-396]. De acuerdo con esto, la expresión proteica de los VGLUTs parece ser modificada por la lesión de nervios periféricos. Así, Hughes y cols. (2004), demostraron que la axotomía del nervio ciático de la rata induce la disminución de la proteína del VGLUT1 en las terminales centrales de receptores cutáneos de bajo

umbral y mecanorreceptores musculares, los cuales terminan en las astas dorsales y ventrales de la médula espinal [378]. Lo más probable es que esta disminución resulte de la dramática disminución del VGLUT1 observada en neuronas grandes y medianas de los GARDs luego de la axotomía del nervio ciático, como fuera demostrado en el ratón [366]. También se ha visto una reducción moderada en el número de neuronas inmunoreactivas para el VGLUT2 en los GARDs luego de la axotomía del nervio ciático en el ratón, aunque acompañada de un aumento en la inmunoreactividad del VGLUT2 en una subpoblación de neuronas pequeñas [366]. Sin embargo, y a diferencia del VGLUT1, estos cambios aparentemente no se traducen en los aumentos o disminuciones del VGLUT2 esperados en segmentos lumbares de la médula espinal, probablemente debido al modesto transporte centrífugo a través de proyecciones centrales desde los GARDs y a la presencia de un denso sistema local VGLUT2-positivo (ver arriba) [366].

Dado que se han demostrado cambios en la regulación de la transcripción de los VGLUTs en neuronas del sistema nervioso central inducidos por diferentes estímulos patológicos (ver [397-399]) y basados en los cambios proteicos descritos arriba [366, 378], nuestra hipótesis de trabajo en la presente tesis fue que los transcriptos de los VGLUTs también presentarían alteraciones luego de la lesión de un nervio periférico. Sin embargo, mostramos que no se observan modificaciones en el número de neuronas positivas para el ARNm de VGLUT1 o VGLUT2 en los GARDs (y la médula espinal) del ratón luego de 7 días de la axotomía del nervio ciático. Más aún, sólo observamos una modesta disminución en el número de neuronas positivas para el ARNm del VGLUT3 en neuronas de los GARDs luego de la axotomía. La discrepancia entre los estudios podría ser explicada

debido a diferencias en las técnicas (hibridación *in situ* vs. inmunohistoquímica) y las cepas de los ratones utilizados (BALB/c vs. NMRI).

Como fue descrito anteriormente, se ha observado que ratones transgénicos neonatos expresan el VGLUT3-*Tomato* en neuronas de los GARDs de tamaño mediano y grande que luego desaparecen en la adultez [369]. Un aumento en el número de los PNs de los GARDs de tamaño mediano y grande que expresan el ARNm del VGLUT3 podría ser esperable debido que se ha observado que otras moléculas, como el neuropéptido galanina, también se expresa abundantemente en períodos prenatales y desaparece en la adultez, pero puede ser evocado por una lesión de un nervio periférico [400]. Sin embargo, en el presente trabajo de tesis no hallamos evidencia que suponga un aumento en el transcripto del VGLUT3 en neuronas de los GARDs de ningún tamaño; por el contrario, observamos una modesta disminución en el número de neuronas pequeñas de los GARDs que expresan VGLUT3.

Pese a los cambios moderados reportados en la presente tesis para los transcriptos de los VGLUTs luego de la lesión de un nervio periférico, la disminución de la expresión protéica del VGLUT1 [378] y el VGLUT3 [366], así como del ARNm del VGLUT3 (presente tesis) en las neuronas de los GARDs podría seguir reflejando el esfuerzo de la célula para contrarrestar el exceso de excitabilidad en la médula espinal o inclusive la activación de mecanismos de protección contra niveles tóxicos de glutamato en el espacio extracelular. De hecho, en la *Drosophila*, se ha asociado la sobreexpresión de los VGLUTs con un aumento espontáneo de la liberación del glutamato, alteraciones en el comportamiento y muerte prematura [401]. Como alternativa, se podría especular que, a pesar de la disminución proteica del VGLUT1

y el VGLUT2 luego de una lesión, las neuronas de los GARDs mantienen un proceso activo de transcripción para la manutención de los mecanismos excitatorios posiblemente aumentados a nivel espinal. Tal escenario sería compatible con la disminución de la expresión protéica a nivel de los somas neuronales debido al incremento en el transporte centrífugo de las vesículas sinápticas que contienen los VGLUTs y su posterior uso en las terminales centrales y periféricas [366]. Avalando esta hipótesis, se ha observado que la axotomía del nervio ciático en la rata reduce el número de vesículas sinápticas en las terminaciones centrales de las neuronas aferentes primarias axotomizadas [402], incluyendo neuronas peptidérgicas [403], lo cual sugiere un aumento en la utilización de vesículas sinápticas de centro claro (conteniendo también VGLUTs).

Existe evidencia que apoya el rol del glutamato también en la periferia y durante procesos inflamatorios. De hecho, la estimulación eléctrica de las fibras de tipo A y/o C del nervio ciático, la inyección de formalina periférica y los tratamientos con capsaicina, aumentan los niveles de glutamato en el espacio extracelular de la pata posterior, más que nada debido a su liberación por las terminales nerviosas periféricas que se originan en los somas ubicados en los GARDs [404-406]. De acuerdo con esto, el glutamato que es administrado de manera exógena activa a los receptores periféricos del glutamato, resultando en una despolarización de las fibras C de las neuronas aferentes primarias y por ende la inducción de la conducta dolorosa [406-409]. También resulta interesante que la inflamación de la pata posterior en la rata resulta en el aumento de la expresión de la glutaminasa en los GARDs, siendo esta enzima la encargada de catalizar la síntesis del glutamato desde su precursor denominado glutamina [410, 411]. Es por todo esto que parece

plausible que la inflamación tisular indujera cambios en la expresión de los transcritos de los VGLUTs. Sin embargo, en el presente trabajo de tesis mostramos que la inflamación de la pata posterior no induce cambios detectables en el número de neuronas que expresan el ARNm de los VGLUT1, VGLUT2 o VGLUT3, tanto en los GARDs como en la médula espinal. Todavía queda por determinar si la expresión proteica de los VGLUTs sí es alterada por la inflamación de la pata posterior.

Finalmente, la falta de cambios descrita anteriormente luego de la lesión de un nervio periférico (con la excepción de una modesta disminución del VGLUT3 en neuronas de los GARDs) o de la inflamación tisular, podría reflejar el rol esencial a nivel de la hendidura sináptica glutamatérgico que tienen las vesículas sinápticas, su regulación proteica y su tráfico axonal (ver [102]). En la hendidura sináptica existe una regulación activa y estricta de las vesículas presinápticas y del reciclado de los neurotransmisores, para contrarrestar su depleción en situaciones de mucha actividad (ver [102, 412]). Además, la concentración del glutamato, que es crucial a la hora de definir el contenido del glutamato intravesicular (ver [412]) es dos a tres veces más alta en las terminales nerviosas que en el soma neuronal (ver [413]). Apoyando esto, la inhibición intraplantar de la glutaminasa reduce el edema resultante de la inflamación de la planta de la pata posterior de la rata y la expresión del cFos en las láminas I - II del asta dorsal de la médula espinal, conduciendo a la analgesia que perdura en el tiempo [414]. En conclusión, es posible que la lesión de un nervio y/o la inflamación genere cambios en la expresión de las vesículas sinápticas, proteínas asociadas (incluyendo los VGLUTs) y la maquinaria glutamatérgica neuronal en general, contribuyendo con una regulación

más fina de los mecanismos del dolor a niveles sinápticos más que a nivel del cuerpo celular.

VGLUTs, dolor somático y visceral

La gran parte del conocimiento acerca del rol de los VGLUTs en los mecanismos del dolor se ha obtenido en estudios donde se utilizan ratones knock-out (KO) homo- y heterocigotas (en estos últimos, hay supresión parcial (alrededor del 50%) del VGLUT delecionado). En estos ratones, la deleción de los VGLUTs es global, queriendo decir que el transportador desaparece en cualquier región corporal en la que se encuentre. Más recientemente, se han introducido también ratones VGLUT-KO condicionales, lo cual permite la deleción del VGLUT en subpoblaciones neuronales específicas (Tabla PI.2).

En particular para las estrategias de deleción global, los ratones homocigotas para el VGLUT1 o -2-KO mueren al nacer (no así los ratones VGLUT3-KO) [185, 388]. Por el contrario, el uso de ratones VGLUT1- o 2-KO heterocigotas sí permitió evaluar la influencia de estos transportadores en la conducta animal y el llenado vesicular en la vida adulta [185, 388], porque los animales no mueren. Sin embargo, una desventaja de la supresión global de la expresión de los genes de los VGLUTs es que afecta numerosos sitios y por ende no aporta datos de la contribución de poblaciones neuronales específicas en los mecanismos del dolor. Para evitar estas limitaciones, y gracias al avance tecnológico, han surgido varios ratones con deleción condicionada de VGLUTs, en los cuales se suprime la expresión de un gen en subpoblaciones determinadas de neuronas aferentes primarias. Esto ha permitido identificar más detalladamente la contribución en modalidades

específicas del dolor y conocer mejor las interacciones entre los neurotransmisores glutamatérgicos y neuropeptidérgicos. Actualmente, existen modelos de delección condicional para VGLUT2 y -3. Así, se han generado ratones VGLUT2-KO condicional en: 1) todas las neuronas de los GARDs que expresan VGLUT2 [415]; 2) las neuronas C y A δ peptidérgicas y no peptidérgicas en el GARD [368]; 3) las neuronas que expresan el TRPV1 en los GARDs [389, 416, 417]; 4) las neuronas que expresan TH en los GARDs [389] y 5) las neuronas que expresan el canal de sodio NaV1.8 en los GARDs [418]. Finalmente, el gen del VGLUT3 fue selectivamente suprimido en los mecanorreceptores de fibras C de bajo umbral en los GARDs (realizado mediante la supresión del gen Runx1) [369] (Tabla PI.2).

Estudiando estos diferentes modelos roedores, VGLUT2 y -3 emergen como los transportadores más importantes en la transmisión de diferentes modalidades dolorosas (aunque faltan estudios en ratones con supresión condicional del gen de VGLUT1 para excluir totalmente su participación en mecanismos del dolor). La dramática alteración en las hipersensibilidades tanto térmica como mecánica, evocadas por estímulos nocivos, inflamación tisular o lesión de un nervio periférico en los ratones VGLUT2-KO en todas las neuronas de los GARDs [415], claramente demuestra el rol relevante del VGLUT2 en mecanismos del dolor. Esto es apoyado por los estudios en ratones que presentan supresiones más selectivas [389, 416, 418, 419]. Por ejemplo, la supresión selectiva del gen del VGLUT2 en neuronas de los GARDs que expresaran el NaV1.8, resultó en una disminución importante del marcador c-Fos (un marcador de neuronas excitadas por neurotransmisores excitatorios liberados por las neuronas aferentes primarias) en la lámina II del asta dorsal luego de una estimulación mecánica de la pata posterior [418]. Asimismo,

una supresión del gen del VGLUT2 en neuronas de los GARDs que expresaran el TRPV1, también resultó en disminución de c-Fos en neuronas de las láminas I – III del asta dorsal luego de la estimulación con calor de la pata posterior del animal [389, 416, 417]. Es importante destacar que el efecto de la delección de VGLUT2 en poblaciones neuronales que expresan TRPV1 se vió influenciado por interacciones con los neuropéptidos CGRP y la sustancia P [416, 420]. Así, el bloqueo sistémico de CGRP disminuye aún más la percepción de dolor nociceptivo inducido por calor en los ratones VGLUT2-KO-TRPV1 [389, 416, 417]. Más aún, en estos animales, la inhibición concomitante de SP (pero no CGRP) conduce a la reducción de la hipersensibilidad al estímulo frío. Estas interacciones también tienen lugar durante dolor inflamatorio. En suma, las sensibilidades al frío y al calor, así como las hipersensibilidades durante inflamación tisular transmitidos por neuronas aferentes primarias que expresan TRPV1 y VGLUT2 parecen al menos en parte depender de la interacción entre señalización glutamatérgica y peptidérgica [389, 416, 417] (Tablas PI.3 y PI.4).

Debe notarse también que el VGLUT2 se expresa abundantemente en la periferia, en las terminales nerviosas de las neuronas aferentes primarias en la piel [366] y en órganos viscerales [364, 367]. Por tal motivo, también es posible que la supresión del gen del VGLUT2 y consecuentemente la reducción en su expresión, resultara en una disminución de la liberación neurogénica de glutamato, reduciendo la activación de receptores glutamatérgicos en la periferia, con consecuencias en la conducta dolorosa.

La función del VGLUT3 pareciera ser más selectiva, sobre todo en su participación en la transmisión de la hipersensibilidad mecánica y fría, y asimismo, siendo dependiente del tipo de lesión [187, 421] (Tablas PI.3 y PI.4).

En cuanto al dolor visceral, es mucho menos lo que se sabe. Prácticamente todas las neuronas de los GARDs que inervan el colorrecto y la vejiga urinaria del ratón expresan el VGLUT2, y algunas el VGLUT1 o el VGLUT3. Esto sugeriría que los cambios en su expresión deberían modular el dolor visceral. Sin embargo la supresión heterocigota del gen del VGLUT1 [388] o el VGLUT2 [388] parecen no afectar la respuesta frente a estímulos dolorosos viscerales como la instilación de ácido acético en la cavidad abdominal, en comparación con ratones control. Lo mismo sucede con el VGLUT3 [187]. Se requieren más estudios farmacológicos y en ratones transgénicos condicionales para determinar fundamentalmente el rol del VGLUT2 (dado que es el transportador que presenta mayor expresión en neuronas de los GARDs viscerales) en el dolor visceral.

Desde un punto de vista mecanístico, la supresión de los VGLUTs en las neuronas aferentes primarias alteraría la probabilidad de liberación del glutamato de las terminales nerviosas, tanto centrales como periféricas. De hecho, la cantidad, velocidad de carga y la reserva del glutamato en las vesículas sinápticas están fuertemente influenciadas por el número de copias de los VGLUTs [170, 180, 183-185, 422]. Sin embargo, todavía quedan por realizar estudios que analicen exhaustivamente los mecanismos por los cuales la supresión de los genes de los VGLUTs en las neuronas aferentes primarias afectan la transmisión del dolor.

En conclusión, una gran cantidad de trabajos sugieren que las neuronas aferentes primarias glutamatérgicas junto con sus co-neurotransmisores y el tipo de lesión involucrada (neuropática o inflamatoria) definen de que manera cada uno de los VGLUTs contribuye al dolor [368, 416, 421]. Sin embargo, todavía queda por establecer los mecanismos celulares por los cuales esto sucede, por ejemplo en ratones transgénicos que presentan alteraciones en la expresión de un VGLUT. Otras interacciones que quedan por esclarecer son entre el dolor y la síntesis del glutamato y el llenado vesicular. Por último quedan también por realizar estudios farmacológicos que bloqueen a los VGLUTs, aunque todavía es complejo dado que no existen inhibidores selectivos de los mismos.

Tabla PI.2. Efectos de diversos tipos de supresiones de VGLUTs sobre el dolor nociceptivo y la picazón (las disminuciones se muestran en rojo, la falta de cambio en negro y las líneas muestran modalidades de dolor que no han sido evaluadas. “#” refiere a datos no publicados (Brumovsky). Las acciones concomitantes con neuropéptidos se muestran en violeta: “*” refiere a disminución del dolor nociceptivo en presencia de bloqueo farmacológico concomitante con SP). Tomado de [48].

Table PI.2. Effects on nociceptive pain and itch of various types of VGLUT deletion (Reductions are shown in red, lack of change are shown in black and dashes show pain modalities that have not been assessed. “#” refers to unpublished data (Brumovsky). Concomitant actions with neuropeptides are shown in purple: “*” refers to a reduction in nociceptive pain in the presence of concomitant pharmacological blockade of SP). Taken from [48].

		Dolor Nociceptivo						PICAZÓN
		Térmico		Mecánico		Visceral		
Retirada de la cola	Plato	Hargreaves	Acetona, Etanol frío, Hielo seco	Randall-Sellito	Von Frey			
	Caliente							
KO Global								
VG1 (+/-)	VG1 (+/-)	—	—	—	VG1 (+/-)	VG1 (+/-)	—	
[385]	[385]				[385]	[385]		
VG2 (+/-)	VG2 (+/-)	VG2 (+/-)	—	—	VG2 (+/-)	VG2 (+/-)	—	
[385, 184]	[385, 184]	[385, 184]			[385]	[385]		
—	VG3 (-/-)	VG3 (-/-)	VG3 (-/-)	VG3 (-/-)	VG3 (-/-)	VG3 (-/-)	—	
	[186, 418]	[186]	[186, 418]	[186]	[186, 418]	#		
KO Específico								
VG2-GARD	—	VG2-GARD	—	VG2-GARD	VG2-GARD	—	VG2-GARD	
[412]		[412]		[412]	[412]		[412]	
VG2-nocicept.	VG2-nocicept.	VG2-nocicept.	VG2-nocicept.	VG2-nocicept.	VG2-nocicept.	—	VG2-nocicept.	
[365]	[365]	[365]	[365]	[365]	[365]		[365]	
—	—	VG2-TRPV1	VG2-TRPV1	VG2-TRPV1	VG2-TRPV1	—	VG2-TRPV1	
		[386, 417, 413]	* [413]	[386]	[386, 417, 413]		[386, 417, 413]	
—	VG2-TH	VG2-TH	—	VG2-TH	VG2-TH	—	VG2-TH	
	[386]	[386]		[386]	[386]		[386]	
—	VG2-Nav1.8	VG2-Nav1.8	VG2-Nav1.8	VG2-Nav1.8	VG2-Nav1.8	—	VG2-Nav1.8	
	[415]	[386, 415]	[415]	[414]	[415]		[386, 415]	
—	—	VG3-GARD	—	VG3-GARD	VG3-GARD	—	—	
		[366]		[366]	[366]			

VG1 (+/-), VGLUT1-KO; VG2 (+/-), VGLUT2-KO; VG3 (-/-), VGLUT3-KO; VG2-GARD, VGLUT2-GARD-KO; VG2-nocicept., VGLUT2-nociceptors-KO; VG2-TRPV1, VGLUT2-TRPV1-KO; VG2-TH, VGLUT2-TH-KO; VG2-Nav1.8, VGLUT2-Nav1.8-KO; VG3-GARD, VGLUT3-GARD-KO.

Tabla PI.3. Efectos de la supresión de VGLUTs sobre el dolor inflamatorio. Las disminuciones se muestran en rojo, la falta de cambio en negro y los guiones muestran modalidades de dolor que no han sido evaluadas. "&" refiere a Draxler *et al.*, quienes observaron ausencia de hiperalgesia [421]. En violeta, se muestran las acciones concomitantes con neuropéptidos: El signo "δ" refiere a reducción de nocicepción en presencia de bloqueo farmacológico concomitante con CGRP y/o SP; El signo "+" se refiere a reducción de nocicepción en presencia de bloqueo farmacológico concomitante con CGRP y SP; El signo "£" refiere a reducción de nocicepción en presencia de bloqueo farmacológico concomitante con CGRP; y el signo "**", refiere a reducción de nocicepción en presencia de bloqueo farmacológico concomitante con SP. Tomado de [48].

Table PI.3. Effects on inflammatory pain of various types of VGLUT deletion. (Reductions or lack of change of the different pain modalities are shown in red and black, respectively. Dashes indicate pain modalities that have not been assessed. "&" refers to Draxler *et al.* 2014 [423] who show absence of hyperalgesia. Concomitant actions with neuropeptides are shown in purple: "δ" refers to reductions in pain behavior in the presence of concomitant pharmacological blockade of CGRP and/or SP; "+" refers to reductions in pain behavior in the presence of concomitant pharmacological blockade of SP and CGRP; "£" refers to reductions in pain behavior in the presence of concomitant pharmacological blockade of CGRP; "**" refers to reductions in pain behavior in the presence of concomitant pharmacological blockade of SP. Taken from [48].

Tabla PI.4. Efectos de la supresión de VGLUTs sobre el dolor neuropático. Las disminuciones se muestran en rojo, la falta de cambio en negro y las líneas muestran modalidades de dolor que no han sido evaluadas. SNI: Lesión por ligadura del nervio peroneo y tibial; PSNL: Ligadura parcial del nervio ciático. Tomado de [48].

Table PI.4. Effects on neuropathic pain of various types of VGLUT deletion. Reductions are shown in red, lack of change are shown in black and dashes show pain modalities that have not been assessed. SNI: Spared nerve injury; PSNL: Partial sciatic nerve ligation. Taken from [48].

Lesión de nervios periféricos mixtos, viscerales y no-viscerales, y correlación con dolor

Proyecto II. La axotomía de ramos tributarios de los nervios pélvico y pudiendo induce cambios en la neuroquímica de neuronas de los ganglios anexos a la raíz dorsal y la médula espinal del ratón

Efectos de la axotomía de los ramos ventrales L6-S1 en ratones sobre la neuroquímica de neuronas GARDs.

El factor de transcripción 3 dependiente de AMPc es un miembro de la familia ATF/CREB de factores de transcripción con dominio de cierre de leucina (ver [424]). La axotomía del nervio ciático [425], la axotomía posganglionar del ganglio cervical superior [426] y la compresión del nervio óptico [427], todos inducen la expresión *de novo* de ATF3 en los cuerpos celulares de motoneuronas y neuronas sensitivas de roedores [425], neuronas autonómicas [340, 426] y en células ganglionares de la retina [427]. En el presente trabajo mostramos que la axotomía de los nervios que inervan órganos pélvicos y estructuras perineales en el ratón también induce una dramática regulación de ATF3 en una gran proporción de neuronas de los GARDs L6-S1. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado recientemente que la compresión del nervio rectal inferior de la rata por inflado de un globo retrouterino induce la expresión *de novo* de ATF3 en neuronas de los GARDs S1 [428]. Nuestros presentes resultados también complementan un estudio previo que muestra que la axotomía de las ramas ventrales L6-S1 induce un aumento en la regulación de ATF3 en múltiples neuronas de la cadena lumbar simpática [340].

Hace mucho tiempo que se ha propuesto que el ATF3 se encuentra involucrado en la regeneración nerviosa y supervivencia neural [424, 429, 430]. Curiosamente, también se ha propuesto una asociación entre dolor posquirúrgico, adhesiones peritoneales (ver [431, 432] crecimiento de las fibras nerviosas dentro de las adhesiones [433]). De manera similar, se ha propuesto que el dolor pélvico crónico luego de un parto vaginal particularmente difícil surge como consecuencia de la lesión y subsecuente serie de reinervaciones aberrantes de los nervios uterinos [434-436]. Por lo tanto, se podría decir que el aumento en la regulación de ATF3 en neuronas de los GARDs (estudio presente) y LSC viscerales y no-viscerales [340] luego de la axotomía del tronco L6-S1 participa en los mecanismos de inervación aberrante de adhesiones peritoneales o reinervación de tejidos y órganos denervados durante los procedimientos quirúrgicos o traumáticos de las cavidades inferiores abdominales/pélvicas, contribuyendo potencialmente a la sensación de dolor.

El CGRP es probablemente el neuropéptido de expresión constitutiva más abundante en neuronas no-viscerales pequeñas, medianas y algunas grandes de los GARDs (ver [437]) y junto con la sustancia P, es considerado un neurotransmisor clave, involucrado en la vía de señalización neuropática (ver [203]). Se ha demostrado que la axotomía (ver [205, 438]), la compresión crónica [206, 207, 439] y la lesión parcial del nervio ciático [206] disminuyen la regulación de la proteína y el transcripto del CGRP en neuronas aferentes primarias no-viscerales. El CGRP también es un neuropéptido predominante en neuronas viscerales de los GARDs (ver[39]), aunque el efecto de la lesión de nervios periféricos sobre su expresión ha sido sólo analizado en relación a los nervios craneales. Así, la

axotomía de los nervios glossofaríngeos y los nervios del seno carotideo en ratas (inervando estructuras craneales y del cuello) resulta en la disminución del número de neuronas que expresan la proteína del CGRP [280]. La axotomía del nervio vago, el cual inerva el estómago en su total longitud [440], incluyendo la vejiga urinaria, el colon y el recto distal [441], también reduce el número de neuronas positivas para el transcrito del CGRP en el ganglio nodoso [442] aunque no así su proteína [280]. En el presente trabajo de tesis demostramos que la axotomía del tronco L6-S1 en el ratón produce una disminución en el número de neuronas de los GARDs que expresan CGRP.

Otra molécula fuertemente relacionada con la señalización nociceptiva y normalmente expresada en neuronas viscerales y no-viscerales de los GARDs de tamaño medio y pequeño es el TRPV1 (ver [39, 443]). La lesión de las proyecciones periféricas de neuronas no-viscerales, como sucede durante la axotomía del nervio ciático [444] o los nervios espinales L4-L5 [444, 445], la ligadura del nervio espinal L4 [446], la transección parcial del nervio ciático [445] y la transección de diferentes ramas del nervio trigémino [447-449] resultan en la disminución de expresión tanto del transcrito de TRPV1 [444, 446] como de su proteína [445, 447-449] en neuronas de los GARDs y el ganglio trigémino. Es interesante observar que la disminución en la expresión de TRPV1 luego de la lesión del nervio trigémino se sigue de un aumento progresivo en su expresión [447-449] en neuronas no lesionadas o regeneradas [449], sugiriendo un rol regenerativo para el TRPV1 luego de una lesión. En este trabajo de tesis demostramos que la axotomía de las ramas tributarias del nervio pélvico en el ratón también provoca la disminución en la expresión del TRPV1 en neuronas de los GARDs L6-S1. Aún queda por determinarse

si la disminución en la expresión del TRPV1 en neuronas de los GARDs L6-S1 y sus proyecciones periféricas se sigue también de un progresivo aumento en neuronas vecinas no-dañadas o durante la regeneración nerviosa. De ser así, podría especularse que mientras que el TRPV1 podría contribuir con la regeneración de nervios dañados, su aumento podría facilitar también a los mecanismos involucrados en el dolor luego de una cirugía o trauma pélvico.

Las neuronas viscerales [269] y no viscerales [270, 450] de los GARDs también expresan el marcador noradrenérgico TH. Previamente, demostramos en el ratón que la axotomía del nervio ciático genera una tendencia hacia la reducción en el número de neuronas de los GARDs L4-L5 que expresan TH en ratones [270]. Asimismo, la compresión crónica del nervio ciático en la rata [283] y la ligadura del nervio espinal en ratones transgénicos que expresan EGFP bajo el promotor de la TH [282] también indujo una disminución en el transcripto de TH [283] o EGFP [282]. En el presente trabajo de tesis, demostramos que la axotomía de L6-S1 induce una significativa disminución del número de neuronas de los GARDs TH-IR que proyectan a través del nervio pélvico y perineal en el modelo de ratón. De acuerdo con nuestros resultados, la axotomía de los nervios vago y glosofaríngeo también provoca la disminución de la proteína de TH [280] y de su actividad enzimática [281] en los ganglios nodoso y petroso, respectivamente. El rol funcional de TH en neuronas viscerales y no-viscerales de los GARDs y en neuronas aferentes primarias craneales aún es desconocido, aunque varias líneas de trabajo apoyan su rol en sensación y dolor (ver [277]).

El hecho de que en roedores las neuronas viscerales y no-viscerales de los GARDs sean ampliamente glutamatérgicas [136, 451] ha sido recientemente

confirmado por la expresión de los VGLUTs. De este modo, el nervio ciático de roedores [101, 187, 366] así como la vejiga urinaria [364] o neuronas GARDs que proyectan el colorrecto [367] expresan los tres tipos de VGLUTs (tipo 1, 2 y 3). El VGLUT2 se expresa ampliamente en neuronas de los GARDs de todos los tamaños tanto viscerales como no-viscerales, seguido por VGLUT1 en neuronas grande y medianas, y VGLUT3 preferentemente en neuronas pequeñas (ver [451]). La axotomía del nervio ciático en ratones reduce el número de neuronas que expresan el VGLUT1, y hasta cierto punto también el VGLUT2 en neuronas de los GARDs L4-5 [366]. Por el contrario, solo se observa una modesta disminución en el número de neuronas de los GARDs que expresan VGLUT3 luego de la axotomía del nervio ciático en ratones (ver Resultados del Proyecto 1), lo cual sugiere que la transcripción y traducción de los VGLUTs podría estar modulada por vías diferentes luego de la lesión [451] (ver Resultados Proyecto 1). En el presente proyecto de tesis, la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 sólo generó una disminución significativa en el número de neuronas VGLUT2-IR, sin afectar aquellas que expresan VGLUT1. Tal disminución en VGLUT2 estaría ocurriendo en neuronas de tamaño mediano ya que las neuronas GARDs grandes y pequeñas no parecen ser afectadas. Además, hemos detectado un aumento en la señal de inmunoreactividad de VGLUT2 en neuronas pequeñas de los GARDs, de acuerdo con una observación similar en neuronas pequeñas no-viscerales luego de la axotomía del nervio ciático en ratones [366]. La falta de efecto en VGLUT1 intriga, dado que la lesión de un nervio no-visceral claramente disminuye la expresión de la proteína [366]. Sin embargo, podría especularse que ya que los GARDs L6-S1 contienen una mezcla de neuronas viscerales y no-viscerales, el

efecto de la lesión del nervio periférico podría no impactar del mismo modo la expresión del VGLUT1 en ambas poblaciones celulares, resultando en una "efecto de dilución" y una aparente falta de cambio.

Efectos de la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 en la médula espinal del ratón.

La axotomía, y otros tipo de lesiones del nervio ciático [425, 452-454] o la avulsión de la raíz ventral [454] inducen un marcado aumento de la expresión de ATF3 en motoneuronas ubicadas en el ensanchamiento lumbar de la médula espinal de la rata [425, 452-454] y del humano [454]. En este proyecto de tesis demostramos en ratones que la lesión de los ramos tributarios del nervio pélvico también induce la expresión *de novo* de ATF3 en motoneuronas lumbares y lumbosacras y en neuronas de la columna celular intermediolateral a niveles lumbosacros. Esta observación coincide con estudios previos en ratas en los cuales se propone que la axotomía del nervio hipogástrico o pélvico induce la expresión de ATF3 en neuronas preganglionares parasimpáticas sacras y lumbares [455]. Al menos una proporción de las motoneuronas afectadas por la axotomía de las ramas ventrales L6-S1 se ocupan de la inervación eferente suministrada por el nervio pudendo hacia varios músculos estriados de la pelvis [456]. El aumento de ATF3 observado en la columna celular intermediolateral de la médula espinal lumbosacra posiblemente ocurre en neuronas parasimpáticas preganglionares que proyectan a través de los nervios pélvico y pudendo hacia el GMP [46, 85, 455]. Por el contrario, la naturaleza de las neuronas del área X que muestran un aumento *de novo* en la expresión de ATF3 permanece desconocida. Como sucede con los GARDs, un

aumento de ATF3 en neuronas de la médula espinal reflejaría los esfuerzos celulares por sobrevivir y favorecer la regeneración axonal luego de la lesión [424, 429, 430].

También hemos observado en este trabajo una moderada disminución en la inmunoreactividad del CGRP y el TRPV1 en el asta dorsal de la médula espinal, ipsilateral a la axotomía de las ramas ventrales L6-S1. La disminución se vio reflejada en la reducción de la densidad del número de botones inmunoreactivos y de la señal inmunoreactiva en las láminas I-III (CGRP) o exclusivamente en la lámina II (TRPV1). Tales cambios modestos contrastan con la mayor disminución de CGRP o TRPV1 observada en neuronas de los GARDs L6-S1 luego de la axotomía de sus ramos tributarios. De hecho, se hubiesen esperado efectos más pronunciados, considerando la importancia de la contribución de las proyecciones centrales de las neuronas de los GARDs a la expresión espinal de CGRP (ver [359] y TRPV1 [457, 458]). Sin embargo, inclusive la axotomía del nervio ciático en la rata de 14 días de duración produce tan sólo una modesta reducción (aunque más notoria que en el presente estudio) en la densidad de la inmunoreactividad de CGRP y en la intensidad de la fluorescencia en la lámina I-III del asta dorsal, a pesar de la reducción masiva del número de neuronas de los GARDs afectados [236]. Asimismo, las contribución de fibras provenientes desde los niveles inferiores y superiores a la lesión, como se sugiere por la considerable pero no completa reducción de la expresión del CGRP luego de la rizotomía dorsal en la rata [459, 460], en el gato [459] [461] y en el ratón [226, 359], podrían también explicar parte de los modestos cambios observados en este trabajo. Finalmente, aunque todavía siga bajo debate respecto al TRPV1 (ver [462]), se han descrito en el ratón [359, 463, 464] y en la rata [458, 465] números discretos de neuronas espinales [359, 458,

462-464, 466] o células gliales [465, 467] sintetizadoras de CGRP [359] y TRPV1 [458, 463-467] que podrían enmascarar los efectos de la lesión del nervio periférico. Alternativamente, ya que el vaciado de neurotransmisor en las terminales centrales de las neuronas de los GARDs puede mostrar una demora en comparación con el efecto observado en sus cuerpos celulares, otra posibilidad es que los tiempos de sobrevivencia mayores a 7 días revelaran mayores magnitudes de cambio.

Finalmente, observamos aquí que la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 no indujo alteraciones en la expresión del VGLUT1 y el VGLUT2 en la médula espinal. En un estudio previo en el ratón, hemos demostrado que la axotomía del nervio ciático no induce cambios en la expresión inmunohistoquímica espinal de los mencionados VGLUTs [366]. Curiosamente, en el primer estudio en ratas en el que se muestra una disminución del VGLUT1 en la médula espinal luego de la axotomía del nervio ciático, el efecto fue muy pronunciado en las astas ventrales y lámina V, especialmente a partir de las 2 semanas de sobrevivencia; a nivel del asta dorsal superficial se observó un efecto moderado a tiempos de sobrevivencia mayores a 1 semana [378]. Por lo tanto, se podría especular que mayores tiempos de sobrevivencia luego de la axotomía de las ramas ventrales de los nervios raquídeos L6-S1 resultarían en mayores alteraciones en la inmunoreactividad de VGLUT1, al menos en el asta ventral. Respecto del VGLUT2, la falla para detectar cambios luego de la axotomía de las ramas ventrales de L6-S1 se podría explicar dado el modesto transporte de VGLUT2 en neuronas de los GARDs hacia la médula espinal [366], la presencia de un abundante VGLUT2 expresado en las neuronas del asta dorsal [101, 108, 127, 204, 365, 366], e incluso la contribución de vías descendentes [379]. Apoyando este concepto, observamos

una similar falta de cambio luego de la axotomía del nervio ciático para el receptor tipo 1 (Y1R) del neuropéptido tyrosina (NPY) en las capas superficiales del asta dorsal [237], aún cuando el receptor es activamente transportado por las proyecciones centrales de las neuronas GARDs [225]. También en el caso del Y1R, su abundante expresión local en interneuronas y proyecciones neurales (ver [228]) es una razón para justificar los escasos cambios luego de la lesión.

Lesión nerviosa y dolor crónico pélvico: potenciales implicancias

El dolor crónico pélvico y la lesión nerviosa parecerían estar íntimamente relacionadas, al menos en una proporción de pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos en la cavidad abdominal inferior/pélvica, a intervenciones obstétricas o que hubieran experimentado un trauma. Así, el atrapamiento del nervio pudiendo debido al uso de mallas transvaginales para la reconstrucción quirúrgica en mujeres con prolapso de órganos pélvicos [468] o por remodelación ósea o muscular en atletas [469] son causas reconocidas de dolor crónico pélvico. El atrapamiento de los nervios ilioinguinal, iliohipogástrico y/o pudiendo han sido asociados con dolor pélvico posoperatorio en pacientes mujeres tratadas por incontinencia de estrés con cabestrillo de ubicación medio-uretral, libre de tensión, mínimamente invasiva (ver [470]). Las fracturas pélvicas y acetabular (siendo los accidentes automotrices las principales causas) resultan en un dolor pélvico persistente y crónico en una proporción de los pacientes afectados, y se ha sugerido una asociación con la lesión de nervios vecinos [471, 472]. Finalmente, el dolor pélvico crónico derivado de la histerectomía [473], cesárea [474], partos dificultosos [434, 436, 475, 476] e incluso un esfuerzo excesivo durante la defecación [435] también han sido

asociados a la lesión nerviosa. Por lo tanto, la lesión de un nervio permanece como un factor relacionado con el desarrollo del dolor pélvico crónico. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares aún son desconocidos.

Se han propuesto tres preguntas principales, particularmente en relación con la participación de nervios lesionados durante el dolor crónico posquirúrgico: "... ¿primero, qué nivel de lesión nerviosa es requerida para inducir los cambios necesarios para generar dolor neuropático? Segundo, ¿puede el daño tisular no-nervioso causar dolor neuropático? Por último, ¿cual es la contribución relativa de los cambios centrales y periféricos en el sistema nervioso?" [477]. Los resultados obtenidos en este proyecto de tesis en ratones abordan la última pregunta, y sostienen la hipótesis de que al menos en el sistema nervioso periférico, los cambios neuroquímicos observados en ganglios que contienen neuronas aferentes viscerales y no-viscerales luego de la lesión, y que también sugieren alteraciones en la transmisión aferente, podría ser relevante en la generación y mantenimiento del dolor pélvico crónico luego de intervenciones quirúrgicas. Como sucede con el dolor no-visceral, se requiere de más estudios para caracterizar los cambios fenotípicos, y para explicar si hay y cuál sería la relación entre ellos y la generación y mantenimiento del dolor pélvico crónico.

Otra cuestión relevante es si los nervios/neuronas sensitivas viscerales y no-viscerales están ambos involucrados en el dolor crónico pélvico. En particular, al analizar dolor crónico posquirúrgico, el mayor énfasis parecería ubicarse en el dolor neuropático detectado en área de insición y su asociación con la lesión de nervios parietales no-viscerales [478-484]. De hecho, la mayoría de las estrategias analgésicas diseñadas para prevenir el dolor crónico posquirúrgico implementadas

en la actualidad asumen que el daño nervioso en la zona de insición quirúrgica y el dolor asociado son los componentes mas importantes [468, 482-487]. Sin embargo, la lesión de nervios viscerales parece ser también importante para el dolor crónico posquirúrgico [488]. Esto es sugerido por las observaciones en pacientes que reportan dolor crónico posquirúrgico cerca o en el sitio de incisión, así como en el área abdominal central e inferior (dolor profundo), luego de una cirugía gastrointestinal [479]. Apoyando aún más un procesamiento visceral aferente alterado, se observó que el dolor visceral, pero no el dolor insicional o referido, durante la primer semana luego de colecistectomía laparoscópica se asocia con un dolor crónico inexplicable de mas de 12 meses de duración [489]. Finalmente, se ha sugerido en pacientes sometidas a intervenciones obstétricas que el dolor neuropático asociado a la cicatriz, así como el dolor visceral representado por la presencia de dolor abdominal y pélvico (frecuentemente relacionado con contracciones uterinas), pueden desarrollarse e inclusive coexistir [490, 491]. Curiosamente, la modulación de la transmisión aferente mediada por analgesia epidural [485] o estimulación del nervio sacro [492] reduce eficientemente la incidencia de dolor crónico posquirúrgico, incluyendo el dolor profundo. Sin embargo, requiere establecerse cual es el efecto relativo de la analgesia epidural o la estimulación del nervio sacro sobre las aferentes viscerales y no-viscerales.

En conclusión, la lesión de nervios mixtos viscerales y no-viscerales conlleva a una significativa alteración neuroquímica en los GARDs y en la médula espinal. Cambios en éstas y potencialmente en otras moléculas relacionadas a la nocicepción podrían contribuir al dolor resultante de la lesión de nervios parietales e intrapélvicos. Nosotros no hemos estudiado los cambios inducidos por la axotomía

de las ramas ventrales L6-S1 en neuronas de los GARDs que forman los nervios pélvico y pudendo en el ratón en lo relativo a su identidad como viscerales o no-viscerales, aunque la proximidad de la lesión utilizada en el presente proyecto de tesis con los cuerpos celulares afectados naturalmente implica la afectación de una gran proporción de ambas poblaciones. Futuros experimentos deberían incluir la evaluación de los cambios ocurridos en las neuronas GARD viscerales y no-viscerales identificadas, por ejemplo mediante el trazado axonal selectivo, y el análisis luego de lesiones más específicas de los nervios pélvico, pudendo y parietal. Esto permitirá establecer el grado de participación de cada población neural en los mecanismos de dolor pélvico.

Análisis experimental de estrategias terapéuticas farmacológicas, celulares y nanotecnológicas contra el dolor crónico

Proyecto III. La activación espinal del receptor tipo 1 del neuropéptido tirosina reduce la alodinia mecánica y al frío en ratas con compresión crónica del nervio ciático

La activación espinal del Y1R reduce la alodinia mecánica y térmica de ratas con LCC

En el presente trabajo de tesis, demostramos que la activación espinal del Y1R resulta en un efecto antialodínico mecánico y térmico (frío) en ratas con neuropatía periférica inducida por compresión crónica del nervio ciático. Estos resultados confirman así observaciones previas realizadas en ratas con otro tipo de neuropatía periférica (axotomía del nervio ciático) en las cuales se observó que la aplicación intratecal de NPY [493] o un agonista selectivo del Y1R atenúa el reflejo flexor, signo utilizado como índice de conducta dolorosa en animales así lesionados [494].

Nuestros resultados se ajustan también a lo observado en estudios en los que se utilizaron antagonistas selectivos de los diferentes receptores de NPY, con los que fue también posible disecar los efectos analgésicos del péptido. Así, en estudios realizados en ratas con inflamación crónica [246] o aguda [495] de la pata posterior por inyección intraplantar de CFA o formalina, respectivamente, se observó que el efecto analgésico de NPY intratecal es bloqueado mediante la coaplicación de un antagonista selectivo del Y1R. Así, tal bloqueo resultó en la recuperación de la hiperalgesia inducida por calor [246] frente a la inyección de CFA, o de la conducta aversiva frente a la inyección de formalina [495]. El efecto analgésico de la

activación del Y1R durante inflamación crónica fue confirmado recientemente en ratas tratadas con CFA, en las que se observó que la aplicación de un agonista selectivo del Y1R por la vía intratecal resulta en un efecto antihiperalgésico térmico [496]. Finalmente, usando un modelo de lesión selectiva de los nervios peróneo y tibial [497], o un modelo de dolor postoperatorio consistente en la incisión de piel y músculos plantares [498], se observó que la coaplicación de NPY- antagonista selectivo del Y1R impide el efecto antialodínico mecánico [497] o antihiperalgésico térmico [498] del péptido.

Además de observarse para el Y1R, la activación del Y2R parece participar también en la modulación del dolor, aunque se han reportado efectos contradictorios. Así, la coaplicación intratecal de NPY y un antagonista selectivo del Y2R en ratas con lesión selectiva de los nervios peróneo y tibial del nervio ciático resulta en bloqueo del efecto antialodínico del NPY [497], apoyando un rol analgésico para el Y2R. Tal efecto analgésico también fue observado en ratas con axotomía del nervio ciático tratadas con un agonista selectivo del Y2R [494]. Por el contrario, en ratas con lesión por incisión plantar [498] la coaplicación intratecal de NPY-antagonista Y2R disminuye la hiperalgnesia térmica inducida por calor [498], sugiriendo que la activación del Y2R conlleva a la proalgnesia. Finalmente, la coaplicación intratecal de NPY con antagonistas específicos del Y2R en ratas con inflamación aguda de la pata posterior inducida por formalina, no alteró los efectos inhibitorios del NPY en estos animales [495]. Si bien las razones para estas discrepancias observadas en el rol del Y2R deben ser esclarecidas, es posible que su acción moduladora sobre el dolor dependa del tipo lesión ocasionada (neuropatía vs.

inflamación; dolor agudo vs. dolor crónico) y los mecanismos proalgésicos asociados.

Finalmente, la importancia a nivel espinal del Y1R fue demostrada de una manera algo indirecta en estudios realizados en ratas a las que se les administró un conjugado de la toxina saporina con NPY por la vía intratecal, lo que induce muerte por internalización del conjugado NPY-saporina por neuronas espinales que expresan el Y1R [499, 500]. Cabe mencionar que el Y1R se expresa en un gran número de neuronas espinales, mientras que el Y2R parece estar ausente en las mismas (ver [230] y siguiente sección). De esta manera, se observó que la eliminación de neuronas espinales positivas para el Y1R en ratas normales conduce a la disminución de las respuestas reflejas nociceptivas inducidas por calor y estímulos químicos cutáneos [499, 500]. Asimismo, la eliminación de tales neuronas condujo a la disminución de la hiperalgesia térmica asociada a la inflamación producida por CFA [500].

Posibles mecanismos asociados al efecto antialodínico de la activación espinal del Y1R

De los 5 receptores de NPY conocidos hasta el momento, 2 de ellos han sido los que se han visto más relacionados con los mecanismos del dolor: receptores Y1- e Y2R (ver [230]). Aún cuando se identificó muy temprano la presencia de los varios receptores asociados al NPY en la médula espinal de varias especies, incluyendo los roedores [459], la localización exacta de Y1R e Y2R estuvo sujeta a debate por varios años. Por un lado, el Y1R parecía asociarse exclusivamente al cuerpo celular de una subpoblación de neuronas de los GARDs [227, 501], así como

a un número de interneuronas localizadas en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal de la rata [227, 228]. Por el contrario, se sugirió tempranamente que además de expresarse en una subpoblación de los GARDs, el Y2R también sería transportado por los axones periféricos y centrales de tales neuronas y no se hallaría expresado en neuronas espinales [502]. Así, todo efecto de NPY a nivel exclusivamente espinal debía ser contemplado desde la perspectiva de la presencia del Y2R en las terminales aferentes primarias en el asta dorsal, y del Y1R en neuronas espinales. Hoy se sabe que tanto el Y1R como el Y2R son de localización espinal presináptica [225, 226], y que el Y1R se halla expresado a nivel local en una variedad de tipos neuronales de la médula espinal [223, 228]. Por el contrario, aún hoy ha sido imposible demostrar la presencia del Y2R en neuronas de la médula espinal [226]. Basándonos en esta evidencia, los efectos antialodínicos observados en la presente tesis, con activación específica del Y1R, podrían tener lugar tanto a nivel pre- como postsináptico.

Desde el punto de vista presináptico, y haciendo honor a la ya conocida presencia del Y2R en las terminales aferentes primarias según fuera demostrado en el ratón [226], se observó que la activación presináptica del Y2R reduce las corrientes postsinápticas excitatorias, siendo esto compatible con una disminución en la excitabilidad de neuronas espinales [503, 504]. Más aún, tal activación presináptica estaría asociada al bloqueo de la liberación de neurotransmisores excitatorios [503], incluyendo el glutamato [505]. La activación espinal del Y1R en terminales aferentes primarias también afecta la liberación de neurotransmisores excitatorios [503]. Esto ha sido recientemente demostrado en ratas con inflamación periférica crónica, en las que se observó que la analgesia inducida por el NPY

intratecal depende de la inhibición de la liberación de la sustancia P en la neurona aferente primaria, siendo tal efecto dependiente de los receptores Y1R e Y2R [496]. En el contexto de los presentes resultados de tesis, es así factible que el efecto antialodínico mecánico y térmico del agonista Y1R sea en parte consecuencia de la reducción de la liberación de neurotransmisores excitatorios desde terminales aferentes primarias que expresan el receptor [225]. Tal efecto sobre la secreción de neurotransmisores excitatorios conllevaría a una menor excitabilidad de interneuronas y neuronas de proyección (ver [230, 232] para más detalles). Sin embargo, es importante destacar que la lesión de nervios periféricos induce una disminución en la expresión del Y1R en los GARDs de la rata (ver[230]). Esto sugeriría que la carga de receptores transportados por las terminales centrales de neuronas aferentes primarias, y su presencia en posición presináptica a nivel espinal, sería baja. En tal caso, podría especularse que el efecto antialodínico observado en ratas con LCC luego de la administración de Leu³¹Pro³⁴ se basaría especialmente en la modulación de neuronas espinales que expresan Y1R. Apoyando tal hipótesis, demostramos previamente que existe una multiplicidad de tipos neuronales (interneuronas y neuronas de proyección) que expresan Y1R [228].

Las interneuronas excitatorias conforman un 60-70% de la población neuronal de la lámina I-III. Generalmente se las considera glutamatérgicas ya que la mayoría de sus terminales nerviosas en el asta dorsal contienen VGLUT2 [384-386] y también expresan somatostatina [227]. Asimismo, muchas de las interneuronas positivas para el Y1R ubicadas en las láminas I-II colocalizan con somatostatina [227]. Más aún, el 97,5% de las terminaciones axonales

dependientes de interneuronas somatostatina positivas presentes en las láminas I-II coexpresan también el VGLUT2 [108]. En conjunto, esto sugiere que muchas de las neuronas Y1R positivas en la lámina II son interneuronas excitatorias, y explicaría que la aplicación de un agonista Y1R atenuara el tono excitatorio espinal por medio de su inhibición [504].

Por otro lado, el efecto antialodínico derivado de la activación espinal del Y1R también podría deberse, aunque parezca contradictorio, a la inhibición de interneuronas inhibitorias [232]. Se ha demostrado que la neuropatía periférica induce, al menos en la lámina I, alteraciones en la homeostasis aniónica de las neuronas localizadas en tal lámina por disminución en la expresión del transportador potasio-cloro (KCC2). Esto conduce a cambios en el gradiente aniónico transmembrana, donde la activación de receptores GABAérgicos pasa de ser inhibitorio a excitatorio [506, 507]. En consecuencia, la vía GABAérgica normalmente inhibitoria se convierte en excitatoria durante estados de dolor neuropático. Todavía se desconoce si los receptores de NPY se expresan en interneuronas GABAérgicas o glicinérgicas, pero la habilidad del NPY para suprimir las corrientes de GABA y glicina es consistente con estudios que muestran que estos neurotransmisores en varias ocasiones colocalizan o son liberados en sinapsis del asta dorsal superficial [508, 509]. Con este escenario de fondo, la potencial inhibición de neuronas GABAérgicas que expresan el receptor inhibitorio Y1R impediría la liberación del GABA/glicina, produciendo analgesia por bloqueo de esta vía excitatoria aberrante.

Finalmente, existe un número de neuronas de proyección presentes en la lámina I, IV-VI y X que expresan el Y1R [228], y que muy posiblemente expresen también el receptor NK1R del neuropéptido excitatorio sustancia P [510].

En suma, es factible que la aplicación intratecal del Y1R, y sus efectos antialodínicos observados en el presente trabajo en ratas con LCC, se deban tanto a acciones sobre terminales aferentes primarias, diferentes tipos de interneuronas, y la inhibición directa de la transmisión de información dolorosa hacia niveles superiores del neuroeje por neuronas de proyección positivas para el Y1R.

Proyecto IV. Administración sistémica de células derivadas de la médula ósea, promotoras de la regeneración axonal y acción analgésica en el modelo de degeneración walleriana

Efectos de las CMMO sobre regeneración nerviosa

En este trabajo de tesis, demostramos que el trasplante sistémico de las CMMO acelera el comienzo de la regeneración y mejora la amplitud de la CMAP en ratas con compresión transitoria del nervio ciático, lo que sugiere la presencia de axones regenerados. Tales efectos parecen estar mediados por la presencia de CMMOs en los nervios lesionados, como lo confirma la presencia de células carecientes de fenotipo de célula de Schwann en el área distal al daño. Esta migración selectiva y exclusiva hacia el nervio dañado [347] refuerza la hipótesis planteada acerca de la existencia de un mecanismo endógeno de reclutamiento gatillado por la lesión del nervio y sugiere la existencia de una interacción entre las células trasplantadas y el nervio lesionado.

El análisis por citometría de flujo de células vivas por medio de la puerta CD45/SSC-H mostró las dos poblaciones clásicas de la fracción mononuclear, los CD45^{bajos} asociados a blastos y los CD45^{altos} relacionados con los linfocitos y monocitos. La presencia de granulocitos contaminantes fue identificada por medio de la expresión de CD45^{alto} y una mayor complejidad celular, mientras que los precursores eritroides fueron identificados por medio de la expresión de CD45^{bajos} y una menor complejidad celular. Menos de un 20% de las CMMO expresaron el marcador panmacrofático CD68 y el marcador de linaje mieloide, CD11b. La otra

población que expresó CD45⁺/CD68⁻/CD11b⁻/CD3⁺ y baja cantidad de granulocitos resultaron ser células del linaje linfoide. Un grupo de células CD45⁺/CD105⁺, con mediana cantidad de granulocitos fue identificado en la region de los blastos y correspondían a una pequeña proporción de CEM presentes en la fracción de las CMMO. Es importante destacar que las ratas Wistar tienen una proporción diferente mieloide/linfoide (10:90) en la sangre periférica, a comparación de otras especies como el ser humano [511]. El mismo concepto puede ser extrapolado a la médula ósea o la composición de las CMMO. Esto explica los bajos niveles de expresión observados en los marcadores leucocíticos CD68 y CD11b y la abundancia de células del linaje linfoide.

Luego de la compresión transitoria del nervio ciático, los neutrófilos son las primeras células inmunes en infiltrar el área distal dentro de las 8 primeras horas, pero su presencia es de corta duración [512]. En días, los monocitos que circulan son reclutados y se convierten en la población dominante y responsable de la degeneración completa [513]. Considerando la composición de células transplantadas en este proyecto de tesis (9% de granulocitos, 8% de precursores eritroides y más del 60% de células mononucleares), y la habilidad regenerativa de la fracción mononuclear durante la degeneración walleriana, se podría hipotetizar que el porcentaje pequeño de granulocitos transplantados dejará el sitio de la lesión en las primeras horas después de la lesión, del mismo modo en que lo hacen los granulocitos endógenos. De ser esto así, los efectos regenerativos observados después de la lesión del nervio ciático podrían ser explicados por la fracción mononuclear.

Efecto de las CMMO sobre el dolor neuropático

En el presente trabajo de tesis también hemos demostrado que una única administración sistémica de las CMMO previene completamente la disminución del umbral de retirada ante un estímulo mecánico, compatible con una típica hipersensibilidad mecánica observada en ratas con constricción del nervio ciático [514, 515]; de hecho, las ratas tratadas con las CMMO permanecieron libres de dolor durante todo el período evaluado, en comparación con las ratas no-tratadas. Los estudios que analizan el rol analgésico de las CMMO son pocos, sin embargo, uno de ellos ha demostrado que la inyección unilateral de las CMMO en el músculo esquelético de las extremidades posteriores de ratas con neuropatía diabética corrige la hiperalgesia al frío y mecánica, y mejora la circulación vascular, así como la velocidad de conducción sensitiva y motora de los nervios afectados [516, 517].

Nuestros resultados también se alinean con algunos estudios que utilizan las CEMO para controlar el dolor neuropático crónico inducido por varios modelos de lesión. Así, su inyección sistémica ha demostrado reducir la alodinia térmica y mecánica en roedores sometidos a varios tipos de lesión nerviosa [514, 518, 519]. La administración intramuscular ipsilateral, intraganglionar e intratecal de las CEMO ha resultado efectiva también [518, 520, 521], con la aparición de efectos prolongados e igualmente eficientes a cuando las CEMO son inyectadas, tanto en estadios tempranos como tardíos de dolor crónico neuropático por lesión compresiva, al menos usando la vía intratecal [519]. Finalmente, las CEMO han resultado exitosas en la reducción del dolor en pacientes con degeneración del disco lumbar [522] u osteoartritis [523].

Posibles mecanismos de acción de las CMMO

Cuando se trata de las CEMO, se han propuesto una serie de mecanismos para explicar sus efectos regenerativos una vez que las mismas son reclutadas en los tejidos blanco. Así, se ha propuesto la transdiferenciación a CS [524], la aceleración de la remoción de desechos celulares [525] y la liberación de factores tróficos y de crecimiento que contribuyen con el crecimiento axonal y la neuroprotección [526, 527]. En cuanto a los mecanismos involucrados en la acción analgésica de las CMMO sistémicas aún quedan por ser establecidos. Sin embargo, si se considera la posibilidad de que las CMMO migren y aniden tanto en los nervios lesionados como en la médula espinal, los GARDs y la corteza pre-frontal, como ya ha sido mostrado para las CEMO in diferentes modelos animales de dolor [518, 519, 528], se podría esperar una acción parácrina en el sitio de lesión neural, hacia donde estas células migran [347]. Apoyando este concepto, se ha propuesto recientemente a la neuromodulación como un mecanismo relevante de acción de las CEMO [347, 529, 530]. En este sentido, si tal evidencia pudiera ser extrapolada a las CMMO, se podría especular que estas células desencadenarían efectos anti-inflamatorios incluyendo el cambio del fenotipo de los macrófagos desde un estado pro- a otro anti-inflamatorio, la reducción de la secreción de interleuquinas pro-inflamatorias (IL) y la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como lo son la IL-10 [517] y el TGF- β 1 [520]. En un escenario como este, las CMMO podrían actuar sobre el dolor neuropático reduciendo la activación y proliferación de la microglia y astrocitos espinales y ganglionares, suprimiendo la trasmisión sináptica excitatoria y reduciendo la frecuencia del potencial de acción [519].

En conclusión, el rol benéfico de las CMMO en la injuria nerviosa expuestos en el presente trabajo, que se produce por mecanismos que todavía quedan por ser determinados, sugiere que estas células podrían ser útiles como estrategia terapéutica analgésica, o inclusive actuar como adyuvantes asociados a drogas analgésicas convencionales, colaborando en la reducción de severos efectos adversos.

Proyecto V. Desarrollo de liposomas multivesiculares para la liberación controlada de fármacos para el tratamiento del dolor.

Síntesis de LMVs como estrategia de liberación de drogas analgésicas

En esta etapa del proyecto propuesto, se ha logrado poner a punto la metodología para la síntesis de LMVs utilizando la tecnología DepoFoam® desarrollada por Kim y cols. [334]. Los LMVs obtenidos presentan una estructura esférica al momento de su preparación con un tamaño que ronda el rango de los 15-30 μm , que concuerda con los datos que se informan en bibliografía [336]. Se han reportado tamaños entre 10 μm hasta 60 μm , siendo los tamaños más frecuentemente los observados en el rango de 10-20 μm [531]. Se observa en las imágenes de microscopía una granulosidad en su estructura que se correspondería a las cavidades internas, las mismas podrían ser apreciadas mejor mediante la utilización de microscopía electrónica. Por otro lado, también se observa que las drogas patrones utilizadas para estudiar el perfil cinético de liberación quedan retenidas en las cavidades luego de tiempos avanzados en los ensayos. A medida que transcurre el tiempo los LMVs sufren una reestructuración de las cavidades internas, dando en ciertos casos a liposomas amorfos o que conservan una estructura redondeada pero pequeña. En nuestro caso, luego de transcurrido el tiempo de liberación se observan estos tipos de estructuras, sugiriendo que las liberaciones no solo ocurren por difusión sino también por erosión.

A fin de poner a punto la técnica de encapsulación de drogas en los LMVs y hacer ensayos de caracterización de la cinética de liberación, se eligieron

compuestos de fácil detección. En primer término se utilizó la droga denominada *Bodipy*®. Sin embargo, la cinética de liberación de esta droga presentó *self-quenching*. Por este motivo, optamos por utilizar un método espectrofotométrico, utilizando Rojo Ponceau-S como sonda de detección. Utilizando este colorante se calcularon encapsulaciones entre el 60-70%. Para realizar los ensayos de liberación, en primera instancia los LMVs fueron incluidos en bolsas de diálisis, donde se tomaban muestras del medio circundante donde se incluyó dichas bolsas. Sin embargo, no se obtuvo reproducibilidad en los resultados, por lo que se optó por tomar muestras a partir de la incubación de las mismas en tubos de vidrio a distintos tiempos, como se detalló anteriormente. Con esta metodología se obtuvieron mejores resultados y se logró continuar con este tipo de ensayos. En ensayos de cinética de liberación para el Rojo Ponceau-S se liberó el 66 ± 5 % de la droga encapsulada durante un período de 336 hs. Con respecto a la morfina, se logró un 50 ± 3 % de encapsulación con una liberación del 32 ± 10 % de la droga encapsulada durante un período de 168h, donde los LMVs fueron incubados de forma dinámica a 37 °C. Esta liberación condice con la reportada en la literatura [532] donde se logró un 53 ± 4 % de efectividad en la encapsulación y donde se demostró un remanente cercano al 70% en LMVs al cabo de una semana de incubación en condiciones dinámicas en suero humano.

Respecto a los ensayos de estabilidad, los LMVs conteniendo Rojo Ponceau-S solo liberaron el 4 ± 1 % del colorante encapsulado al cabo de 168 hs. En el caso de los LMVs conteniendo morfina la cantidad liberada fue ligeramente superior a 4 ± 3 % para la primera semana. En bibliografía se reporta una liberación mínima a 4°C independientemente de la droga encapsulada [334, 531, 533]. En el caso de

nuestros LMVs esto podría tener que ver con la osmolaridad [534] ya que en nuestro caso partimos de 5mg de droga, mientras que bibliográficamente se reportan cantidades mayores de partida para lograr la encapsulación [535-537] y por otro lado, también en el futuro se podrían agregar reguladores osmóticos para mejorar la estabilidad de estos liposomas [534].

La cinética de liberación de los LMVs puede ser ajustada a diversos modelos de cinética como se detalló en la sección de métodos. Las cinéticas de liberación poseen un mejor ajuste al modelo de Hixon Crowell y al modelo de primer orden, ya que en estos modelos el R^2 de correlación es más cercano a 1. También se observa un buen ajuste al modelo de Rigtar Peppas el cual contempla también el mecanismo de liberación, pudiéndose decir en este último caso que la liberación ocurre en los dos casos por difusión y por erosión.

Las liberaciones que puedan sufrir los LMVs está muy vinculada al ambiente en el que se encuentran ya que pueden ser afectados por diversos factores como el pH o la temperatura [538]. En reportes bibliográficos se demostró que las características del medio donde se encuentran suspendidos los LMVs tiene una incidencia directa en las cinéticas. Así LMVs cargados con citarabina incubados durante 14 días a 37°C en distintos medios como plasma humano, fluido cerebroespinal artificial, buffers con distintos pH (2, 3, 6 y 7) demostraron liberaciones más rápidas en plasma humano que en medios de bajo contenido proteico o de pH similar. Con respecto a los % de encapsulación obtenidos en este trabajo, se observa que estos concuerdan con los reportados en la bibliografía. El trabajo realizado por Taehee y Sinil [536] se reporta un 50% de encapsulación para morfina, mientras que el trabajo de Sinil Kim y Mitchell S Turker [334] se reporta

un 53% para Rojo Ponceau-S. Los porcentajes de encapsulaciones pueden ser reguladas por parámetros como el tiempo de agitación mecánica en la preparación, la cantidad de droga a encapsular, la osmolaridad de las soluciones acuosas, el solvente acuoso que lleva el encapsulante, entre otras. Puede observarse que una solución 0,1% de Rojo Ponceau-S en PBS logra una encapsulación del 53% mientras que el mismo soluto disuelto en H₂O reporta una encapsulación del 80% [334]. La concentración de L-lisina de las soluciones estabilizadoras de la preparación de LMVs juega un papel muy importante en la encapsulación, siendo esta mayor a una concentraciones 40-50 mM [539]. Esta solución viene acompañada de glucosa o sacarosa lo que afecta la osmolaridad de las soluciones, donde se observa que las mejores encapsulaciones se logran con soluciones entre 4 y 5% de sacarosa. Es importante destacar el papel que juega la agitación mecánica en la segunda emulsión de la preparación de LMVs, donde a mayores agitaciones los LMVs disminuyen su tamaño, lo que para ciertas aplicaciones puede hacerlos más tentadores. Sin embargo, esta no debe ser excesiva ya que disminuirá la encapsulación pasados los 10 segundos y aumentará las probabilidades de que las cavidades internas se rompan y se fusionen dando cavidades más grandes y por ende liberaciones más cortas [334].

Nuestros siguientes pasos serán terminar de validar la encapsulación de morfina en LMVs y ensayar dos estrategias adicionales: 1) encapsulación de clonidina en LMVs, y 2) co-encapsulación de morfina y clonidina. Asimismo, también será esencial iniciar los ensayos en modelos animales de dolor agudo y crónico. La clonidina, es un agonista de receptores α_2 adrenérgicos, comúnmente utilizado como coadyuvante en terapia que requiera aplicación intratecal de analgésicos (ver

[540]). La combinación con morfina produce un efecto sinérgico, con efectos analgésicos mayores a los observados con cualquiera de las dos drogas por separado. Asimismo, el uso de esta combinación de opioide/agonista adrenérgico permite la disminución de las dosis de morfina utilizada y por lo tanto la disminución de los efectos adversos asociados (ver [541]).

La co-encapsulación de morfina y clonidina en LMVs, o inclusive la coaplicación de LMVs cargados independientemente con ambas drogas, no ha sido aún reportada en la bibliografía o utilizada en la clínica. La única formulación de LMVs conteniendo morfina se conoce comercialmente como DepoDur®, en concentraciones de 10mg/ml, 15mg/ml y 20mg/ml [542]. El uso de Depodur® ha permitido disminuir el uso de analgésicos potentes como el fentanilo, por la vía sistémica en aplicaciones postquirúrgicas [543]. Por ello, esperamos que la co-encapsulación de morfina y clonidina en LMVs represente una nueva alternativa para la reducción tanto del consumo de analgésicos potentes por los pacientes con dolor, así como de las dosis intratecales requeridas de morfina. Finalmente, este tipo de estrategia se esperaría que fuera de utilidad tanto en pacientes con dolor agudo post-quirúrgico (de hasta 7 días de duración), así como pacientes con dolor crónico refractario a diversos tratamientos (por ejemplo, pacientes oncológicos).

Finalmente, debe destacarse que la optimización del uso de LMVs cargados con drogas analgésicas podría además permitir reducir el uso de bombas elastoméricas para la infusión intratecal de analgésicos gracias a sus cinéticas de liberación relativamente prolongadas. Esto beneficiaría al paciente, quien no debería ser implantado con catéteres y bombas en bolsillos subdérmicos (esto último

también sería útil para evitar algunas complicaciones asociadas como formación de granulomas y riesgo de infecciones) (ver [544]).

Conclusiones

El dolor crónico afecta a una de cada 5 personas en el mundo (International Association for the Study of Pain (IASP), 2006) y en un porcentaje significativo de pacientes se debe a lesiones traumáticas de nervios periféricos, siendo definido como “neuropático” [284]. El tratamiento del dolor neuropático ó por procesos inflamatorios es complejo, y tan sólo alrededor del 50% de los pacientes afectados responde al mismo, eventualmente con alivio parcial [314]. Agravando la situación, la mayoría de los analgésicos utilizados actualmente causan algún tipo de efecto adverso, lo que condiciona su uso en altas dosis o por tiempo prolongado [315]. Finalmente, desde el punto de vista social y económico, estas condiciones dolorosas llevan frecuentemente a estados de sufrimiento físico y mental prolongados, afectan gravemente las relaciones interpersonales, y ocasionan pérdidas importantes de productividad y grandes gastos para el paciente y su familia, así como para el sistema de salud [315, 545]. Por ende, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos continúa. Actualmente, el desarrollo de drogas analgésicas efectivas se ve influenciado por tres conceptos: 1) la identificación de nuevos blancos farmacológicos [546]; 2) la exploración de terapias multifarmacológicas [547-549]; y 3) las mejoras en la dosificación y duración de la acción de una droga, así como la reducción de su degradación [550]. En este proyecto de tesis, abordamos los tres conceptos expuestos anteriormente y obtuvimos resultados promisorios para el abordaje de los mismos.

En primer lugar, en cuanto a los VGLUTs, demostramos: (1) la presencia de los transcritos del VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3 en proporciones diferentes de PNs de los GARDs, también con distintos tamaños celulares, siendo el VGLUT2 el transportador más abundante; (2) un mayor porcentaje de PNs positivos para el

ARNm del VGLUT1 en los GARDs, comparado con trabajos publicados previamente sobre su proteína correspondiente [366]; (3) la presencia de todos los VGLUTs en la médula espinal, siendo el VGLUT2 el más abundante, seguido por el VGLUT1 cuyos PNs se expresaron preferentemente en el núcleo dorsal de Clarke. Finalmente, y al igual que en un trabajo publicado recientemente en ratones neonatos [369], el VGLUT3 se detectó débilmente en algunos PNs del asta dorsal profunda; (4) luego de la axotomía del nervio ciático, una pequeña pero significativa disminución del porcentaje de los PNs en los GARDs que expresan el transcripto de VGLUT3; los transcriptos de VGLUT1 y VGLUT2 no presentaron cambios; y (5) la falta de cambios detectables en los transcriptos de los tres VGLUTs, luego de la inflamación de la planta de la superficie plantar de la pata posterior. **La hipótesis de una expresión dependiente del tipo de VGLUT considerado en GARDs y médula espinal fue confirmada, mientras que la hipótesis sobre cambios significativos en la expresión de los mismos frente a diferentes tipos de lesión no lo fue, confirmándose sólo para el VGLUT3 luego de la axotomía del nervio ciático.**

En segundo lugar, mientras que el análisis de las alteraciones en la expresión de ciertas moléculas en neuronas aferentes no-viscerales, particularmente luego de varios tipos de lesión del nervio ciático, contribuye a la comprensión de los mecanismos involucrados en el dolor crónico asociado a la neuropatía periférica [438, 551, 552], las consecuencias neuroquímicas y conductuales de la lesión de los nervios que inervan estructuras perineales y/o pélvicas ha recibido menor atención. En el presente trabajo de tesis abordamos esta problemática y observamos que: 1) se producen considerables alteraciones en la expresión de ciertos marcadores,

algunos directamente relacionados con la nocicepción; y 2) los cambios observados se asemejan a aquellos evocados por una lesión no-visceral de neuronas de los GARDs. **Estos resultados confirman la hipótesis enunciada para este proyecto y sugieren el posible rol de las moléculas estudiadas en el dolor pélvico crónico luego de la lesión de nervios intrapélvicos.**

En tercer lugar, mostramos que la aplicación intratecal del agonista Y1R Leu³¹Pro³⁴ reduce la conducta alodínica frente a estímulos mecánicos o térmicos en ratas con LCC a medida que las dosis del agonista aumentan. Así, confirmamos observaciones previas realizadas en ratas con otro tipo de neuropatía periférica (axotomía del nervio ciático) en las cuales se observó que la aplicación intratecal de Leu³¹Pro³⁴ atenúa signos de la conducta alodínica [494]. **Estos resultados condicen con la hipótesis enunciada para este proyecto y apoyan el concepto del uso de agonistas Y1R de acción espinal como estrategia terapéutica contra el dolor crónico inducido por neuropatía periférica.**

En cuarto lugar, utilizando un modelo de degeneración walleriana mostramos en el presente trabajo de tesis los efectos benéficos que tiene el trasplante sistémico de CMMOs sobre la regeneración y recuperación funcional del nervio dañado. De particular importancia para esta tesis es la observación de un efecto preventivo del dolor neuropático dependiente de la presencia de CMMO. El modelo experimental expuesto incluye tres características importantes que podrían ser relevantes en estrategias de terapia celular: 1) la disponibilidad inmediata de las células, así como la intervención aguda, minimizarían el daño tiempo-dependiente e inclusive permitirían el trasplante autólogo (el tiempo existente entre la aislación de CMMOs y su inyección en el animal experimental no superó los 60 min) [553,

554]; 2) el trasplante de CMMOs a través de la arteria caudal media es un modelo atractivo de administración no-invasiva [555]; y 3) la migración espontánea de las células transplantadas colabora con la reparación morfológica y funcional del nervio dañado. Sumado a estos tres puntos, la posibilidad de administración aguda de CMMOs adultas inmediatamente después de la lesión neuropática y sin necesidad de cultivos celulares prolongados podría evitar consecuencias negativas resultantes del cultivo celular, como lo son la transformación maligna [556], facilitando además el trasplante autólogo y reduciendo los efectos colaterales asociados al alotrasplante [553]. **La hipótesis de que la administración sistémica de las CMMO promueve una acción antialodínica y regenerativa en ratas con compresión transitoria del nervio ciático se ve así confirmada.**

Por último, avanzamos en la puesta a punto de la metodología necesaria para la síntesis de LMVs y el cargado de drogas analgésicas. Así, logramos la fabricación de LMVs y el encapsulado de morfina, siendo esta liberada con una cinética del 34% en 170 horas. **La hipótesis planteada para este proyecto se cumple parcialmente, quedando por delante la optimización de la fabricación de LMVs cargados de morfina y/o clonidina, así como su ensayo en modelos animales de dolor.**

"En su conjunto, los resultados volcados en la presente tesis permiten imaginar un escenario traslacional en el cual el estudio de la biología de sistemas asociados a la transmisión del dolor y la búsqueda de posibles blancos terapéuticos conllevara en última instancia al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su aplicación en seres humanos (Figura C1.1)".

Conclusions

Chronic pain affects one every 5 people in the World (International Association for the Study of Pain (IASP), 2006) and in a significant percentage of patients is due to traumatic peripheral nerve injuries, being defined as "neuropathic" [284]. The treatment of neuropathic or inflammatory pain is complex, and only around 50% of the patients respond to it, eventually with a partial relief [314]. Complicating even more the situation, most of the analgesic drugs currently used have several adverse effects, conditioning their use in high doses or for prolonged periods of time [315]. Finally, from a social and economic point of view, these painful conditions frequently lead to prolonged physical and mental suffering, seriously affect interpersonal relationships and cause important losses in productivity and big expenses for the patient and their families and the health system [315, 545]. Thus, the search of new therapeutic agents continues. Currently the development of effective analgesic drugs is influenced by three concepts: 1) the identification of new pharmacological targets [546]; 2) the exploration of multipharmacological therapies [547-549]; and 3) improvements in dosages and duration of the action of a drug, as well as the reduction of their degradation [550]. In the present thesis we approached the three concepts previously exposed and obtained promising results for their approach.

First, as for VGLUTs, we showed: (1) presence of the VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 transcripts in different proportions in neuronal subpopulations in the dorsal root ganglia, also applying to cell sizes, being VGLUT2 the most abundant transporter; (2) a higher percentage dorsal root ganglion neurons positive for VGLUT1 transcript, compared with previously published papers describing their corresponding protein [366]; (3) presence of all VGLUTs in the spinal cord, being

VGLUT2 the most abundant, followed by VGLUT1. VGLUT1 neurons were preferably expressed in Clarke's dorsal nucleus. Finally, and as in a recently published paper in neonatal mice [369], VGLUT3 was weakly observed in some neurons of the deep dorsal horn; (4) a small but significant reduction of the percentage of neuronal profiles that express VGLUT3 in dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. VGLUT1 and VGLUT2 transcripts did not show any changes; and (5) the lack of detectable changes of the three VGLUT transcripts after inflammation of the hindpaw **The hypothesis of a VGLUT-dependent differences in the expression patterns in dorsal root ganglia and spinal cord neurons was confirmed, while the hypothesis regarding significant changes in the expression of VGLUTs after different injuries was not confirmed, except for VGLUT3 after sciatic nerve axotomy.**

Second, while the analysis of changes on the expression of certain molecules in non-visceral primary afferent neurons, particularly after several types of sciatic nerve injuries, contribute to the comprehension of the mechanisms involved in chronic pain associated to peripheral neuropathies [438, 551, 552], the neurochemical and behavioral consequences after injury of the nerves that innervate perineal and/or visceral structures have received minor attention. In the present thesis we approached this problem and observed: 1) substantial modifications in the expression of certain markers, some directly related with nociception; and 2) that changes observed resemble those induced by a non-visceral injury of dorsal root ganglion neurons. **These results confirm the hypothesis enunciated for this project and suggest the possible role of the**

studied molecules in the development of chronic pelvic pain after an injury of the intrapelvic nerves.

Third, we showed that intrathecal administration of the Y1R agonist Leu³¹Pro³⁴, reduces the mechanical and thermal allodynic behavior in rats with chronic constriction of the sciatic nerve in a dose-dependent manner. We thus confirm previous observations performed in rats with other types of peripheral neuropathies (sciatic nerve axotomy) in which the intratecal administration of Leu³¹Pro³⁴ reduces allodynic behavioral signs [494]. **These results confirmed the stated hypothesis for this project and support the concept of using spinal Y1R agonists as a therapeutic strategy against chronic pain induced by peripheral neuropathy.**

Fourth, using a wallerian degeneration model, we show in the present thesis the beneficial effects of the systemic transplantation of bone marrow mononuclear cells on regeneration and functional recovery of the damaged nerve. The observation that bone marrow mononuclear cells prevent the development of neuropathic pain is particularly important for the present thesis. The experimental model presented here has also three important characteristics that could be relevant in cell therapy strategies: 1) the immediate availability of the cells and the rapid administration would minimize the time-dependent damage and could allow an autologous transplant (the time between the isolation of the bone marrow mononuclear cells and its injection in the experimental model did not exceed 60 minutes) [553, 554]; 2) the systemic delivery of bone marrow mononuclear cell transplant shown here may be an attractive model of non-invasive administration [555]; and 3) the spontaneous migration of the transplanted has positive effects on

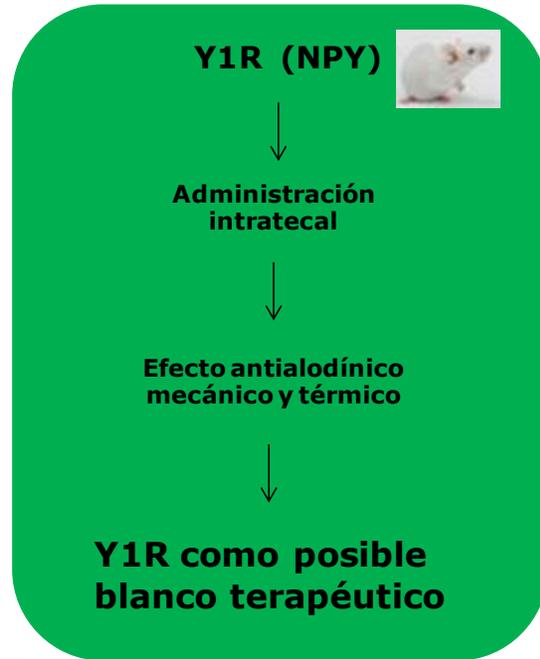
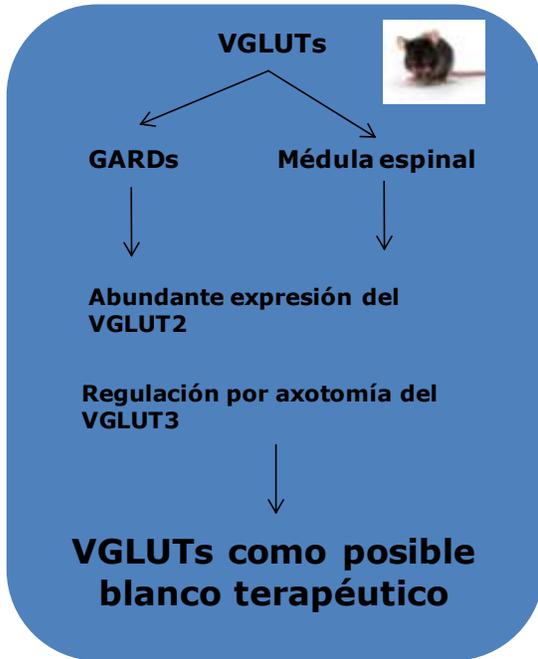
morphological and functional repair of the damaged nerve. In addition to these three points, the possibility of a rapid administration of adult bone marrow mononuclear cells immediately after a neuropathic injury and without the need of prolonged cell cultures could avoid the negative consequences of the cell culturing methods (e.g., malignant transformation) [556], and could also facilitate the autologous transplant with an eventual reduction of the side effects associated to allotransplant [553]. **We confirm the hypothesis that the systemic administration of bone marrow mononuclear cells promotes an antiallodynamic and regenerative action in rats with sciatic nerve crush.**

Finally, we optimized the methodology for the production of multivesicular liposomes and their loading with analgesic drugs. Thereby, we accomplished to produce multivesicular liposomes loaded with morphine with a release kinetic of 34% in approximately 179 hours. **The hypothesis raised for this project is partially accomplished, the optimization of the production of multivesicular liposomes loaded with morphine and/or clonidine remaining to be achieved. Likewise, essays in animals subjected to various pain models remains to be performed.**

"Altogether, the results of the present thesis allow us to imagine a translational scenario in which the study of the biological systems associated to pain mechanisms and the search for possible targets would lead to the development of therapeutic strategies for its administration in human beings (Figure C1.1)".

Figura C1.1. Esquema que resume gran parte de los proyectos abordados en la presente tesis y se destacan los principales resultados y su potencial traslacional en futuras estrategias terapéuticas.

Figure C1.1. Diagram summarizing the great majority of the projects approached in the present thesis, highlighting the main results and their translational potential in future therapeutic strategies.



Bibliografía

1. Funfschilling, U., et al., *Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity*. Nature, 2012. **485**(7399): p. 517-21.
2. Hirrlinger, J. and K.A. Nave, *Adapting brain metabolism to myelination and long-range signal transduction*. Glia, 2014. **62**(11): p. 1749-61.
3. Pannasch, U., et al., *Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(20): p. 8467-72.
4. Mulligan, S.J. and B.A. MacVicar, *Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions*. Nature, 2004. **431**(7005): p. 195-9.
5. Mauch, D.H., et al., *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1354-7.
6. Diniz, L.P., et al., *Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons*. J Biol Chem, 2012. **287**(49): p. 41432-45.
7. Stellwagen, D. and R.C. Malenka, *Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha*. Nature, 2006. **440**(7087): p. 1054-9.
8. Moalem, G. and D.J. Tracey, *Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain*. Brain Res Rev, 2006. **51**(2): p. 240-64.
9. Bushong, E.A., et al., *Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains*. J Neurosci, 2002. **22**(1): p. 183-92.
10. Gao, Y.J. and R.R. Ji, *Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain*. Pharmacol Ther, 2010. **126**(1): p. 56-68.
11. Oberheim, N.A., et al., *Uniquely hominid features of adult human astrocytes*. J Neurosci, 2009. **29**(10): p. 3276-87.
12. Halassa, M.M., T. Fellin, and P.G. Haydon, *The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease*. Trends Mol Med, 2007. **13**(2): p. 54-63.
13. Nedergaard, M., B. Ransom, and S.A. Goldman, *New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 523-30.
14. Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque, *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. Trends Neurosci, 2009. **32**(8): p. 421-31.
15. Shigetomi, E., et al., *Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons*. J Neurosci, 2008. **28**(26): p. 6659-63.
16. Araque, A., et al., *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner*. Trends Neurosci, 1999. **22**(5): p. 208-15.
17. Mitew, S., et al., *Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin*. Neuroscience, 2014. **276**: p. 29-47.
18. Koizumi, S., et al., *UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1091-5.
19. Sierra, A., et al., *Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 483-95.
20. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia*. Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 461-553.
21. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.
22. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.

23. Prinz, M. and J. Priller, *Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(5): p. 300-12.
24. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
25. Armati, P., *The Biology of Schwann Cells*, C.U. Press, Editor. 2007. p. 37-54.
26. Griffin, J.W. and W.J. Thompson, *Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells*. Glia, 2008. **56**(14): p. 1518-31.
27. Yamazaki, S., et al., *Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1146-58.
28. Zhou, X.F., et al., *Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(1): p. 100-5.
29. Schwyn, R.C., *An autoradiographic study of satellite cells in autonomic ganglia*. Am J Anat, 1967. **121**(3): p. 727-38.
30. Zhou, X.F., et al., *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, 1999. **11**(5): p. 1711-22.
31. Lamer, T.J., T.R. Deer, and S.M. Hayek, *Advanced Innovations for Pain*. Mayo Clin Proc, 2016. **91**(2): p. 246-58.
32. Downs, M.B. and C. Laporte, *Conflicting dermatome maps: educational and clinical implications*. J Orthop Sports Phys Ther, 2011. **41**(6): p. 427-34.
33. Schug, S.A., et al., *Neuraxial drug administration: a review of treatment options for anaesthesia and analgesia*. CNS Drugs, 2006. **20**(11): p. 917-33.
34. Pope, J.E. and T.R. Deer, *Intrathecal drug delivery for pain: a clinical guide and future directions*. Pain Manag, 2015. **5**(3): p. 175-83.
35. Wilkes, D., *Programmable intrathecal pumps for the management of chronic pain: recommendations for improved efficiency*. J Pain Res, 2014. **7**: p. 571-7.
36. Flores, J.C., *Medicina del dolor*. 2014.
37. Richner, M., et al., *The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice*. J Vis Exp, 2011(54).
38. Rigaud, M., et al., *Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain*. Pain, 2008. **136**(1-2): p. 188-201.
39. Robinson, D.R. and G.F. Gebhart, *Inside information: the unique features of visceral sensation*. Mol Interv, 2008. **8**(5): p. 242-53.
40. Brookes, S.J., et al., *Extrinsic primary afferent signalling in the gut*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(5): p. 286-96.
41. Berthoud, H.R. and W.L. Neuhuber, *Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system*. Auton Neurosci, 2000. **85**(1-3): p. 1-17.
42. Christianson, J.A., R.J. Traub, and B.M. Davis, *Differences in spinal distribution and neurochemical phenotype of colonic afferents in mouse and rat*. J Comp Neurol, 2006. **494**(2): p. 246-59.
43. Robinson, D.R., et al., *Characterization of the primary spinal afferent innervation of the mouse colon using retrograde labelling*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16**(1): p. 113-24.
44. Blackshaw, L.A., et al., *Sensory transmission in the gastrointestinal tract*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(1 Suppl): p. 1-19.
45. Furness, J.B., *The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections*. Auton Neurosci, 2006. **130**(1-2): p. 1-5.
46. Keast, J.R., *Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation*. Int Rev Cytol, 2006. **248**: p. 141-208.

47. Burnstock, G., *Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2009. **49**: p. 1-30.
48. Malet, M. and P.R. Brumovsky, *VGLUTs and Glutamate Synthesis-Focus on DRG Neurons and Pain*. Biomolecules, 2015. **5**(4): p. 3416-37.
49. Furness, J.B., et al., *Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine*. Prog Neurobiol, 2004. **72**(2): p. 143-64.
50. Priestley, J.V., et al., *Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor*. Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(5): p. 495-505.
51. Lawson, S.N., *The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size*. J Neurocytol, 1979. **8**(3): p. 275-94.
52. West, S.J., et al., *Circuitry and plasticity of the dorsal horn--toward a better understanding of neuropathic pain*. Neuroscience, 2015. **300**: p. 254-75.
53. Light, A.R. and E.R. Perl, *Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers*. J Comp Neurol, 1979. **186**(2): p. 117-31.
54. Ralston, H.J., 3rd, et al., *Morphology and synaptic relationships of physiologically identified low-threshold dorsal root axons stained with intra-axonal horseradish peroxidase in the cat and monkey*. J Neurophysiol, 1984. **51**(4): p. 777-92.
55. Lawson, S.N., et al., *A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones*. J Comp Neurol, 1984. **228**(2): p. 263-72.
56. Averill, S., et al., *Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(7): p. 1484-94.
57. Harper, A.A. and S.N. Lawson, *Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities*. J Physiol, 1985. **359**: p. 47-63.
58. Lawson, S.N., *Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Alpha/beta-fibres*. Exp Physiol, 2002. **87**(2): p. 239-44.
59. Eric R. Kandel, J.H.S., Thomas M. Jessell, *Principles of Neural Science*. 4th ed. 2001, New York, United States of America.
60. Kruger, L., E.R. Perl, and M.J. Sedivec, *Fine structure of myelinated mechanical nociceptor endings in cat hairy skin*. J Comp Neurol, 1981. **198**(1): p. 137-54.
61. Cain, D.M., S.G. Khasabov, and D.A. Simone, *Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study*. J Neurophysiol, 2001. **85**(4): p. 1561-74.
62. Adriaensen, H., et al., *Latencies of chemically evoked discharges in human cutaneous nociceptors and of the concurrent subjective sensations*. Neurosci Lett, 1980. **20**(1): p. 55-9.
63. Koltzenburg, M., C.L. Stucky, and G.R. Lewin, *Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin*. J Neurophysiol, 1997. **78**(4): p. 1841-50.
64. Lewin, G.R. and R. Moshourab, *Mechanosensation and pain*. J Neurobiol, 2004. **61**(1): p. 30-44.
65. Koerber, H.R., et al., *Cutaneous C-polymodal fibers lacking TRPV1 are sensitized to heat following inflammation, but fail to drive heat hyperalgesia in the absence of TPV1 containing C-heat fibers*. Mol Pain, 2010. **6**: p. 58.
66. Bessou, P. and E.R. Perl, *Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli*. J Neurophysiol, 1969. **32**(6): p. 1025-43.
67. Loken, L.S., et al., *Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans*. Nat Neurosci, 2009. **12**(5): p. 547-8.
68. Lewin, G.R., A. Rueff, and L.M. Mendell, *Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia*. Eur J Neurosci, 1994. **6**(12): p. 1903-12.
69. Kwan, K.Y., et al., *TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons*. J Neurosci, 2009. **29**(15): p. 4808-19.

70. Treede, R.D., et al., *Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia*. Prog Neurobiol, 1992. **38**(4): p. 397-421.
71. Davis, K.D. and G.E. Pope, *Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses*. Pain, 2002. **98**(1-2): p. 179-85.
72. Handwerker, H.O., C. Forster, and C. Kirchhoff, *Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli*. J Neurophysiol, 1991. **66**(1): p. 307-15.
73. Schmidt, R., et al., *Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin*. J Neurosci, 1995. **15**(1 Pt 1): p. 333-41.
74. Weidner, C., et al., *Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin*. J Neurosci, 1999. **19**(22): p. 10184-90.
75. Meyer, R.A., et al., *Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey*. Brain Res, 1991. **561**(2): p. 252-61.
76. Kress, M., et al., *Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro*. J Neurophysiol, 1992. **68**(2): p. 581-95.
77. Braz, J., et al., *Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control*. Neuron, 2014. **82**(3): p. 522-36.
78. Rexed, B., *The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat*. J Comp Neurol, 1952. **96**(3): p. 414-95.
79. Burgess, P.R. and E.R. Perl, *Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin*. J Physiol, 1967. **190**(3): p. 541-62.
80. Gobel, S., W.M. Falls, and E. Humphrey, *Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons*. J Neurosci, 1981. **1**(10): p. 1163-79.
81. Fyffe, R.E. and A.R. Light, *The ultrastructure of group Ia afferent fiber synapses in the lumbosacral spinal cord of the cat*. Brain Res, 1984. **300**(2): p. 201-9.
82. Sugiura, Y., C.L. Lee, and E.R. Perl, *Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin*. Science, 1986. **234**(4774): p. 358-61.
83. Craig, A.D. and S. Mense, *The distribution of afferent fibers from the gastrocnemius-soleus muscle in the dorsal horn of the cat, as revealed by the transport of horseradish peroxidase*. Neurosci Lett, 1983. **41**(3): p. 233-8.
84. Craig, A.D., B. Heppelmann, and H.G. Schaible, *The projection of the medial and posterior articular nerves of the cat's knee to the spinal cord*. J Comp Neurol, 1988. **276**(2): p. 279-88.
85. De Groat, W.C., et al., *Horseradish peroxidase tracing of visceral efferent and primary afferent pathways in the cat's sacral spinal cord using benzidine processing*. Neurosci Lett, 1978. **10**(1-2): p. 103-8.
86. Morgan, C., I. Nadelhaft, and W.C. de Groat, *The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus*. J Comp Neurol, 1981. **201**(3): p. 415-40.
87. Ciriello, J. and F.R. Calaresu, *Central projections of afferent renal fibers in the rat: an anterograde transport study of horseradish peroxidase*. J Auton Nerv Syst, 1983. **8**(3): p. 273-85.
88. Nadelhaft, I., et al., *Parasympathetic preganglionic neurons and visceral primary afferents in monkey sacral spinal cord revealed following application of horseradish peroxidase to pelvic nerve*. J Comp Neurol, 1983. **216**(1): p. 36-52.
89. Gobel, S. and W.M. Falls, *Anatomical observations of horseradish peroxidase-filled terminal primary axonal arborizations in layer II of the substantia gelatinosa of Rolando*. Brain Res, 1979. **175**(2): p. 335-40.

90. Sugiura, Y., et al., *Quantitative analysis of central terminal projections of visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers in the guinea pig*. J Comp Neurol, 1993. **332**(3): p. 315-25.
91. Cruz, F., et al., *Fine structure and synaptic architecture of HRP-labelled primary afferent terminations in lamina III of the rat dorsal horn*. J Comp Neurol, 1991. **305**(1): p. 3-16.
92. Nagy, J.I. and S.P. Hunt, *The termination of primary afferents within the rat dorsal horn: evidence for rearrangement following capsaicin treatment*. J Comp Neurol, 1983. **218**(2): p. 145-58.
93. Cruz, F., D. Lima, and A. Coimbra, *Several morphological types of terminal arborizations of primary afferents in laminae I-II of the rat spinal cord, as shown after HRP labeling and Golgi impregnation*. J Comp Neurol, 1987. **261**(2): p. 221-36.
94. Woolf, C.J., *Central terminations of cutaneous mechanoreceptive afferents in the rat lumbar spinal cord*. J Comp Neurol, 1987. **261**(1): p. 105-19.
95. Beal, J.A., C.T. Russell, and D.S. Knight, *Morphological and developmental characterization of local-circuit neurons in lamina III of the rat spinal cord*. Neurosci Lett, 1988. **86**(1): p. 1-5.
96. Shortland, P., C.J. Woolf, and M. Fitzgerald, *Morphology and somatotopic organization of the central terminals of hindlimb hair follicle afferents in the rat lumbar spinal cord*. J Comp Neurol, 1989. **289**(3): p. 416-33.
97. Shortland, P. and C.J. Woolf, *Morphology and somatotopy of the central arborizations of rapidly adapting glabrous skin afferents in the rat lumbar spinal cord*. J Comp Neurol, 1993. **329**(4): p. 491-511.
98. Grudt, T.J. and E.R. Perl, *Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn*. J Physiol, 2002. **540**(Pt 1): p. 189-207.
99. Xu, J., Y. Liu, and G.Y. Zhang, *Neuroprotection of GluR5-containing kainate receptor activation against ischemic brain injury through decreasing tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors mediated by Src kinase*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 29355-66.
100. Xu, H., et al., *Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4*. Neuron, 2013. **77**(1): p. 155-67.
101. Oliveira, A.L., et al., *Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia*. Synapse, 2003. **50**(2): p. 117-29.
102. Santos, M.S., H. Li, and S.M. Voglmaier, *Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse*. Neuroscience, 2009. **158**(1): p. 189-203.
103. Polgar, E., et al., *The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord*. Brain Res, 1999. **833**(1): p. 71-80.
104. Eckert, W.A., 3rd, K.K. McNaughton, and A.R. Light, *Morphology and axonal arborization of rat spinal inner lamina II neurons hyperpolarized by mu-opioid-selective agonists*. J Comp Neurol, 2003. **458**(3): p. 240-56.
105. Kemp, T., et al., *The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord*. Neuroscience, 1996. **75**(4): p. 1231-8.
106. Spike, R.C., et al., *MOR-1-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord: evidence for nonsynaptic innervation by substance P-containing primary afferents and for selective activation by noxious thermal stimuli*. Eur J Neurosci, 2002. **15**(8): p. 1306-16.
107. Todd, A.J., G. Russell, and R.C. Spike, *Immunocytochemical evidence that GABA and neurotensin exist in different neurons in laminae II and III of rat spinal dorsal horn*. Neuroscience, 1992. **47**(3): p. 685-91.
108. Todd, A.J., et al., *The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(1): p. 13-27.

109. Polgar, E., et al., *Characterization of neurons that express preprotachykinin B in the dorsal horn of the rat spinal cord*. Neuroscience, 2006. **139**(2): p. 687-97.
110. Polgar, E., et al., *Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain*. Pain, 2003. **104**(1-2): p. 229-39.
111. Sardella, T.C., et al., *A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn*. Neuroscience, 2011. **192**: p. 708-20.
112. Jinks, S.L. and E. Carstens, *Superficial dorsal horn neurons identified by intracutaneous histamine: chemonociceptive responses and modulation by morphine*. J Neurophysiol, 2000. **84**(2): p. 616-27.
113. Spike, R.C., et al., *A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(9): p. 2433-48.
114. Bernard, J.F., et al., *Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat*. J Comp Neurol, 1995. **353**(4): p. 480-505.
115. Burstein, R., K.D. Cliffer, and G.J. Giesler, Jr., *Cells of origin of the spinothalamic tract in the rat*. J Comp Neurol, 1990. **291**(3): p. 329-44.
116. Todd, A.J., M.M. McGill, and S.A. Shehab, *Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(2): p. 689-700.
117. Al-Khater, K.M. and A.J. Todd, *Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area*. J Comp Neurol, 2009. **515**(6): p. 629-46.
118. Ge, S.N., et al., *Differential expression of VGLUT1 or VGLUT2 in the trigeminothalamic or trigeminocerebellar projection neurons in the rat*. Brain Struct Funct, 2014. **219**(1): p. 211-29.
119. Littlewood, N.K., et al., *The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors*. Neuroscience, 1995. **66**(3): p. 597-608.
120. Todd, A.J., *Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(12): p. 823-36.
121. Antal, M., et al., *Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla*. Neuroscience, 1996. **73**(2): p. 509-18.
122. Kato, G., et al., *Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats*. J Neurosci, 2006. **26**(6): p. 1787-94.
123. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(1): p. 1-105.
124. Sanacora, G., et al., *Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression*. Arch Gen Psychiatry, 2004. **61**(7): p. 705-13.
125. Snyder, S.H. and C.D. Ferris, *Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(11): p. 1738-51.
126. Osikowicz, M., J. Mika, and B. Przewlocka, *The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief*. Exp Physiol, 2013. **98**(2): p. 372-84.
127. Alvarez, F.J., et al., *Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses*. J Comp Neurol, 2004. **472**(3): p. 257-80.
128. Broman, J., S. Anderson, and O.P. Ottersen, *Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in primary afferent terminals throughout the spinal cord dorsal horn*. Eur J Neurosci, 1993. **5**(8): p. 1050-61.

129. Broman, J. and F. Adahl, *Evidence for vesicular storage of glutamate in primary afferent terminals*. Neuroreport, 1994. **5**(14): p. 1801-4.
130. Duggan, A.W. and G.A. Johnston, *Glutamate and related amino acids in cat spinal roots, dorsal root ganglia and peripheral nerves*. J Neurochem, 1970. **17**(8): p. 1205-8.
131. Wanaka, A., et al., *Glutamate-like immunoreactive structures in primary sensory neurons in the rat detected by a specific antiserum against glutamate*. Exp Brain Res, 1987. **65**(3): p. 691-4.
132. Battaglia, G. and A. Rustioni, *Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey*. J Comp Neurol, 1988. **277**(2): p. 302-12.
133. Kai-Kai, M.A. and R. Howe, *Glutamate-immunoreactivity in the trigeminal and dorsal root ganglia, and intraspinal neurons and fibres in the dorsal horn of the rat*. Histochem J, 1991. **23**(4): p. 171-9.
134. Kai-Kai, M.A., *Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat*. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol, 1989. **93**(1): p. 183-93.
135. Azerad, J., Y. Boucher, and B. Pollin, *[Demonstration of glutamate in primary sensory trigeminal neurons innervating dental pulp in rats]*. C R Acad Sci III, 1992. **314**(10): p. 469-75.
136. Keast, J.R. and T.M. Stephensen, *Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport*. J Comp Neurol, 2000. **424**(4): p. 577-87.
137. Navarro, J.F., V. de Castro, and M. Martin-Lopez, *Behavioural profile of selective ligands for mGlu7 and mGlu8 glutamate receptors in agonistic encounters between mice*. Psicothema, 2009. **21**(3): p. 475-9.
138. Valtschanoff, J.G., R.J. Weinberg, and A. Rustioni, *Amino acid immunoreactivity in corticospinal terminals*. Exp Brain Res, 1993. **93**(1): p. 95-103.
139. Persson, S., et al., *Distribution of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the rat spinal cord, with a note on the spinocervical tract*. J Comp Neurol, 2006. **497**(5): p. 683-701.
140. Porcellati, G. and R.H. Thompson, *The effect of nerve section on the free amino acids of nervous tissue*. J Neurochem, 1957. **1**(4): p. 340-7.
141. Dmitrieva, N., et al., *Differential release of neurotransmitters from superficial and deep layers of the dorsal horn in response to acute noxious stimulation and inflammation of the rat paw*. Eur J Pain, 2004. **8**(3): p. 245-52.
142. Pitcher, M.H., A. Ribeiro-da-Silva, and T.J. Coderre, *Effects of inflammation on the ultrastructural localization of spinal cord dorsal horn group I metabotropic glutamate receptors*. J Comp Neurol, 2007. **505**(4): p. 412-23.
143. al-Ghoul, W.M., et al., *Glutamate immunocytochemistry in the dorsal horn after injury or stimulation of the sciatic nerve of rats*. Brain Res Bull, 1993. **30**(3-4): p. 453-9.
144. Hudson, L.J., et al., *Metabotropic glutamate receptor 5 upregulation in A-fibers after spinal nerve injury: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) reverses the induced thermal hyperalgesia*. J Neurosci, 2002. **22**(7): p. 2660-8.
145. Dingledine, R., et al., *The glutamate receptor ion channels*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(1): p. 7-61.
146. Meldrum, B.S., *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*. J Nutr, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1007S-15S.
147. Tzschentke, T.M., *Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction*. Amino Acids, 2002. **23**(1-3): p. 147-52.
148. Kolber, B.J., *mGluRs head to toe in pain*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015. **131**: p. 281-324.
149. Hollmann, M. and S. Heinemann, *Cloned glutamate receptors*. Annu Rev Neurosci, 1994. **17**: p. 31-108.
150. Schoepp, D.D., D.E. Jane, and J.A. Monn, *Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors*. Neuropharmacology, 1999. **38**(10): p. 1431-76.

151. Carlton, S.M., G.L. Hargett, and R.E. Coggeshall, *Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axons in the rat*. Neuroscience, 2001. **105**(4): p. 957-69.
152. Fundytus, M.E., *Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain*. CNS Drugs, 2001. **15**(1): p. 29-58.
153. Karim, F., G. Bhave, and R.W.t. Gereau, *Metabotropic glutamate receptors on peripheral sensory neuron terminals as targets for the development of novel analgesics*. Mol Psychiatry, 2001. **6**(6): p. 615-7.
154. Neugebauer, V., *Metabotropic glutamate receptors: novel targets for pain relief*. Expert Rev Neurother, 2001. **1**(2): p. 207-24.
155. Gasparini, F., R. Kuhn, and J.P. Pin, *Allosteric modulators of group I metabotropic glutamate receptors: novel subtype-selective ligands and therapeutic perspectives*. Curr Opin Pharmacol, 2002. **2**(1): p. 43-9.
156. Attwell, P.J., et al., *Blockade of both epileptogenesis and glutamate release by (1S,3S)-ACPD, a presynaptic glutamate receptor agonist*. Brain Res, 1995. **698**(1-2): p. 155-62.
157. Battaglia, G., J.A. Monn, and D.D. Schoepp, *In vivo inhibition of veratridine-evoked release of striatal excitatory amino acids by the group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in rats*. Neurosci Lett, 1997. **229**(3): p. 161-4.
158. Gerber, G., et al., *Group II and group III metabotropic glutamate receptor agonists depress synaptic transmission in the rat spinal cord dorsal horn*. Neuroscience, 2000. **100**(2): p. 393-406.
159. Ni, B., et al., *Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5607-11.
160. Bellocchio, E.E., et al., *Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter*. Science, 2000. **289**(5481): p. 957-60.
161. Takamori, S., et al., *Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 189-94.
162. Aihara, Y., et al., *Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter*. J Neurochem, 2000. **74**(6): p. 2622-5.
163. Hisano, S., et al., *Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **83**(1-2): p. 34-43.
164. Bai, L., et al., *Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36764-9.
165. Fremeau, R.T., Jr., et al., *The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse*. Neuron, 2001. **31**(2): p. 247-60.
166. Herzog, E., et al., *The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(22): p. RC181.
167. Takamori, S., et al., *Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2)*. J Neurosci, 2001. **21**(22): p. RC182.
168. Varoqui, H., et al., *Identification of the differentiation-associated Na+/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses*. J Neurosci, 2002. **22**(1): p. 142-55.
169. Bellocchio, E.E., et al., *The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8648-59.
170. Daniels, R.W., et al., *A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle*. Neuron, 2006. **49**(1): p. 11-6.

171. Fremeau, R.T., Jr., et al., *The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14488-93.
172. Gras, C., et al., *A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons*. J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5442-51.
173. Schafer, M.K., et al., *Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50734-48.
174. Herzog, E., et al., *Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain*. Neuroscience, 2004. **123**(4): p. 983-1002.
175. Somogyi, J., et al., *GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(3): p. 552-69.
176. Commons, K.G., *Locally collateralizing glutamate neurons in the dorsal raphe nucleus responsive to substance P contain vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3)*. J Chem Neuroanat, 2009. **38**(4): p. 273-81.
177. Seal, R.P., et al., *Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3*. Neuron, 2008. **57**(2): p. 263-75.
178. Naito, S. and T. Ueda, *Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles*. J Neurochem, 1985. **44**(1): p. 99-109.
179. Juge, N., et al., *Metabolic control of vesicular glutamate transport and release*. Neuron, 2010. **68**(1): p. 99-112.
180. Wilson, N.R., et al., *Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6221-34.
181. Moriyama, Y. and A. Yamamoto, *Vesicular L-glutamate transporter in microvesicles from bovine pineal glands. Driving force, mechanism of chloride anion activation, and substrate specificity*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22314-20.
182. Omote, H., et al., *Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport*. Biochemistry, 2011. **50**(25): p. 5558-65.
183. Fremeau, R.T., Jr., et al., *VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate*. Trends Neurosci, 2004. **27**(2): p. 98-103.
184. Wojcik, S.M., et al., *An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7158-63.
185. Moechars, D., et al., *Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain*. J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 12055-66.
186. Tordera, R.M., et al., *Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(1): p. 281-90.
187. Seal, R.P., et al., *Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors*. Nature, 2009. **462**(7273): p. 651-5.
188. Miyazaki, T., et al., *Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(12): p. 2563-72.
189. Masson, J., et al., *Neurotransmitter transporters in the central nervous system*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(3): p. 439-64.
190. Attwell, D., *Brain uptake of glutamate: food for thought*. J Nutr, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1023S-5S.
191. Tao, F., et al., *Evidence of neuronal excitatory amino acid carrier 1 expression in rat dorsal root ganglion neurons and their central terminals*. Neuroscience, 2004. **123**(4): p. 1045-51.

192. Carozzi, V.A., et al., *Expression and distribution of 'high affinity' glutamate transporters GLT1, GLAST, EAAC1 and of GCP11 in the rat peripheral nervous system*. J Anat, 2008. **213**(5): p. 539-46.
193. Vandenberg, R.J. and R.M. Ryan, *Mechanisms of glutamate transport*. Physiol Rev, 2013. **93**(4): p. 1621-57.
194. Piet, R., et al., *Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2151-5.
195. Tzingounis, A.V. and J.I. Wadiche, *Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(12): p. 935-47.
196. Potashner, S.J. and P.L. Tran, *Decreased uptake and release of D-aspartate in the guinea pig spinal cord after dorsal root section*. J Neurochem, 1984. **42**(4): p. 1135-44.
197. Binns, B.C., et al., *Glutamate uptake is attenuated in spinal deep dorsal and ventral horn in the rat spinal nerve ligation model*. Brain Res, 2005. **1041**(1): p. 38-47.
198. Hu, J.H., et al., *Homeostatic scaling requires group I mGluR activation mediated by Homer1a*. Neuron, 2010. **68**(6): p. 1128-42.
199. Nie, H. and H.R. Weng, *Impaired glial glutamate uptake induces extrasynaptic glutamate spillover in the spinal sensory synapses of neuropathic rats*. J Neurophysiol, 2010. **103**(5): p. 2570-80.
200. Niciu, M.J., B. Kelmendi, and G. Sanacora, *Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system*. Pharmacol Biochem Behav, 2012. **100**(4): p. 656-64.
201. Maggi, C.A., *Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves*. Prog Neurobiol, 1995. **45**(1): p. 1-98.
202. Rosenfeld, M.G., et al., *Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing*. Nature, 1983. **304**(5922): p. 129-35.
203. Nitzan-Luques, A., et al., *Dynamic genotype-selective "phenotypic switching" of CGRP expression contributes to differential neuropathic pain phenotype*. Exp Neurol, 2013. **250**: p. 194-204.
204. Malet, M., et al., *Transcript expression of vesicular glutamate transporters in lumbar dorsal root ganglia and the spinal cord of mice - effects of peripheral axotomy or hindpaw inflammation*. Neuroscience, 2013. **248**: p. 95-111.
205. Hokfelt, T., X. Zhang, and Z. Wiesenfeld-Hallin, *Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications*. Trends Neurosci, 1994. **17**(1): p. 22-30.
206. Ma, W. and M.A. Bisby, *Calcitonin gene-related peptide, substance P and protein gene product 9.5 immunoreactive axonal fibers in the rat footpad skin following partial sciatic nerve injuries*. J Neurocytol, 2000. **29**(4): p. 249-62.
207. Nahin, R.L., et al., *Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain*. Pain, 1994. **58**(1): p. 95-108.
208. Bennett, A.D., K.M. Chastain, and C.E. Hulsebosch, *Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP(8-37) in a rodent model of chronic central pain*. Pain, 2000. **86**(1-2): p. 163-75.
209. Massaad, C.A., et al., *Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats*. J Neuroimmunol, 2004. **153**(1-2): p. 171-82.
210. Yu, L.C., P. Hansson, and T. Lundeborg, *The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRP8-37 increases the latency to withdrawal responses bilaterally in rats with unilateral experimental mononeuropathy, an effect reversed by naloxone*. Neuroscience, 1996. **71**(2): p. 523-31.
211. Zhang, L., et al., *Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity*. Pain, 2001. **89**(2-3): p. 265-73.
212. Neugebauer, V., P. Rumenapp, and H.G. Schaible, *Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation*

- and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation.* Neuroscience, 1996. **71**(4): p. 1095-109.
213. Tatemoto, K., *Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(18): p. 5485-9.
214. Larhammar, D. and E. Salaneck, *Molecular evolution of NPY receptor subtypes.* Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 141-51.
215. Grouzmann, E., et al., *Neuropeptide Y Y2 receptor signalling mechanisms in the human glioblastoma cell line LN319.* Peptides, 2001. **22**(3): p. 379-86.
216. Sun, Q.Q., J.R. Huguenard, and D.A. Prince, *Neuropeptide Y receptors differentially modulate G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat thalamic neurons.* J Physiol, 2001. **531**(Pt 1): p. 67-79.
217. Silva, A.P., C. Cavadas, and E. Grouzmann, *Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets.* Clin Chim Acta, 2002. **326**(1-2): p. 3-25.
218. Wang, S.J., *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, 2005. **134**(3): p. 987-1000.
219. Eva, C., et al., *Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor.* Front Neuroendocrinol, 2006. **27**(3): p. 308-39.
220. Nie, M. and L.A. Selbie, *Neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase activity.* Regul Pept, 1998. **75-76**: p. 207-13.
221. Zhang, X., et al., *Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9864-9.
222. Heredia Mdel, P., et al., *Neuropeptide Y rapidly enhances [Ca²⁺]_i transients and Ca²⁺ sparks in adult rat ventricular myocytes through Y1 receptor and PLC activation.* J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 205-12.
223. Zhang, X., et al., *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 U S A, 1994. **91**(24): p. 11738-42.
224. Hökfelt T., B.P., Villar M.J., *Retrograde cellular changes after nerve injury,* in *Encyclopedia of pain,* W.W.D. Schmidt R.F., Editor. 2007, Springer. p. 2122-2126.
225. Brumovsky, P.R., et al., *NPY Y1 receptors are present in axonal processes of DRG neurons.* Exp Neurol, 2002. **174**(1): p. 1-10.
226. Brumovsky, P., et al., *Neuropeptide Y2 receptor protein is present in peptidergic and nonpeptidergic primary sensory neurons of the mouse.* J Comp Neurol, 2005. **489**(3): p. 328-48.
227. Zhang, X., et al., *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, 1999. **11**(7): p. 2211-25.
228. Brumovsky, P., et al., *The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord.* Neuroscience, 2006. **138**(4): p. 1361-76.
229. Gibbs, J., C.M. Flores, and K.M. Hargreaves, *Neuropeptide Y inhibits capsaicin-sensitive nociceptors via a Y1-receptor-mediated mechanism.* Neuroscience, 2004. **125**(3): p. 703-9.
230. Brumovsky, P., et al., *Neuropeptide tyrosine and pain.* Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(2): p. 93-102.
231. Colmers, W.F. and D. Bleakman, *Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons.* Trends Neurosci, 1994. **17**(9): p. 373-9.
232. Smith, P.A., et al., *Spinal mechanisms of NPY analgesia.* Peptides, 2007. **28**(2): p. 464-74.

233. Bennett, G.J., *Animal Models of Pain*, in *Methods in Pain Research*, L. Kruger, Editor. 2001, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 67-92.
234. Wakisaka, S., K.C. Kajander, and G.J. Bennett, *Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy*. *Neurosci Lett*, 1991. **124**(2): p. 200-3.
235. Mark, M.A., L.A. Colvin, and A.W. Duggan, *Spontaneous release of immunoreactive neuropeptide Y from the central terminals of large diameter primary afferents of rats with peripheral nerve injury*. *Neuroscience*, 1998. **83**(2): p. 581-9.
236. Zhang, X., et al., *Effect of peripheral nerve cut on neuropeptides in dorsal root ganglia and the spinal cord of monkey with special reference to galanin*. *J Neurocytol*, 1993. **22**(5): p. 342-81.
237. Brumovsky, P.R., et al., *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*, 2004. **1006**(1): p. 87-99.
238. Landry, M., et al., *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*, 2000. **162**(2): p. 361-84.
239. Zhang, X., et al., *Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(2): p. 729-34.
240. Shi, T.J., et al., *Deletion of the neuropeptide Y Y1 receptor affects pain sensitivity, neuropeptide transport and expression, and dorsal root ganglion neuron numbers*. *Neuroscience*, 2006. **140**(1): p. 293-304.
241. Shi, T.J., et al., *Effect of peripheral axotomy on dorsal root ganglion neuron phenotype and autonomy behaviour in neuropeptide Y-deficient mice*. *Regul Pept*, 1998. **75-76**: p. 161-73.
242. Zhang, X., et al., *Neuropeptide Y and galanin binding sites in rat and monkey lumbar dorsal root ganglia and spinal cord and effect of peripheral axotomy*. *Eur J Neurosci*, 1995. **7**(3): p. 367-80.
243. Kar, S. and R. Quirion, *Quantitative autoradiographic localization of [125I]neuropeptide Y receptor binding sites in rat spinal cord and the effects of neonatal capsaicin, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy*. *Brain Res*, 1992. **574**(1-2): p. 333-7.
244. Wakisaka, S., K.C. Kajander, and G.J. Bennett, *Effects of peripheral nerve injuries and tissue inflammation on the levels of neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat primary afferent neurons*. *Brain Res*, 1992. **598**(1-2): p. 349-52.
245. Ji, R.R., et al., *Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation*. *J Neurosci*, 1994. **14**(11 Pt 1): p. 6423-34.
246. Taiwo, O.B. and B.K. Taylor, *Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors*. *Pain*, 2002. **96**(3): p. 353-63.
247. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 816-24.
248. Gavva, N.R., et al., *Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans*. *Pain*, 2008. **136**(1-2): p. 202-10.
249. Krarup, A.L., et al., *Randomized clinical trial: inhibition of the TRPV1 system in patients with nonerosive gastroesophageal reflux disease and a partial response to PPI treatment is not associated with analgesia to esophageal experimental pain*. *Scand J Gastroenterol*, 2013. **48**(3): p. 274-84.
250. Gavva, N.R., et al., *The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation*. *J Neurosci*, 2007. **27**(13): p. 3366-74.

251. Ciura, S. and C.W. Bourque, *Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality*. J Neurosci, 2006. **26**(35): p. 9069-75.
252. Zygmunt, P.M., et al., *Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 452-7.
253. Bevan, S., T. Quallo, and D.A. Andersson, *Trpv1*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **222**: p. 207-45.
254. Hiura, A., *Is thermal nociception only sensed by the capsaicin receptor, TRPV1?* Anat Sci Int, 2009. **84**(3): p. 122-8.
255. Honore, P., et al., *A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(1): p. 410-21.
256. Chizh, B.A., et al., *The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans*. Pain, 2007. **132**(1-2): p. 132-41.
257. Bennett, D.L., et al., *A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury*. J Neurosci, 1998. **18**(8): p. 3059-72.
258. Molliver, D.C., et al., *IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life*. Neuron, 1997. **19**(4): p. 849-61.
259. Richardson, J.D. and M.R. Vasko, *Cellular mechanisms of neurogenic inflammation*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(3): p. 839-45.
260. Latremoliere, A. and C.J. Woolf, *Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity*. J Pain, 2009. **10**(9): p. 895-926.
261. Vulchanova, L., et al., *Cytotoxic targeting of isolectin IB4-binding sensory neurons*. Neuroscience, 2001. **108**(1): p. 143-55.
262. Joseph, E.K. and J.D. Levine, *Hyperalgesic priming is restricted to isolectin B4-positive nociceptors*. Neuroscience, 2010. **169**(1): p. 431-5.
263. Joseph, E.K., et al., *Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy*. J Pain, 2008. **9**(5): p. 463-72.
264. Tarpley, J.W., M.G. Kohler, and W.J. Martin, *The behavioral and neuroanatomical effects of IB4-saporin treatment in rat models of nociceptive and neuropathic pain*. Brain Res, 2004. **1029**(1): p. 65-76.
265. Ye, Y., et al., *Analgesia targeting IB4-positive neurons in cancer-induced mechanical hypersensitivity*. J Pain, 2012. **13**(6): p. 524-31.
266. Nagatsu, T., M. Levitt, and S. Udenfriend, *Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2910-7.
267. Phillips, R.J. and T.L. Powley, *Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging*. Auton Neurosci, 2007. **136**(1-2): p. 1-19.
268. Qu, Z.D., et al., *Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine*. Cell Tissue Res, 2008. **334**(2): p. 147-61.
269. Brumovsky, P.R., et al., *Dorsal root ganglion neurons innervating pelvic organs in the mouse express tyrosine hydroxylase*. Neuroscience, 2012. **223**: p. 77-91.
270. Brumovsky, P., M.J. Villar, and T. Hokfelt, *Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse*. Exp Neurol, 2006. **200**(1): p. 153-65.
271. Katz, D.M., et al., *Expression of catecholaminergic characteristics by primary sensory neurons in the normal adult rat in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3526-30.
272. Kobayashi, S., et al., *Microvascular system of the lumbar dorsal root ganglia in rats. Part I: a 3D analysis with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts*. J Neurosurg Spine, 2010. **12**(2): p. 197-202.

273. Kummer, W., et al., *Catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea-pig sensory ganglia*. Cell Tissue Res, 1990. **261**(3): p. 595-606.
274. Price, J. and A.W. Mudge, *A subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones is catecholaminergic*. Nature, 1983. **301**(5897): p. 241-3.
275. Price, J., *An immunohistochemical and quantitative examination of dorsal root ganglion neuronal subpopulations*. J Neurosci, 1985. **5**(8): p. 2051-9.
276. Usoskin, D., et al., *Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing*. Nat Neurosci, 2015. **18**(1): p. 145-53.
277. Brumovsky, P.R., *Dorsal root ganglion neurons and tyrosine hydroxylase-an intriguing association with implications for sensation and pain*. Pain, 2016. **157**(2): p. 314-20.
278. Matsushita, N., et al., *Fate of transient catecholaminergic cell types revealed by site-specific recombination in transgenic mice*. J Neurosci Res, 2004. **78**(1): p. 7-15.
279. Zhuo, H., C. Sinclair, and C.J. Helke, *Plasticity of tyrosine hydroxylase and vasoactive intestinal peptide messenger RNAs in visceral afferent neurons of the nodose ganglion upon axotomy-induced deafferentation*. Neuroscience, 1994. **63**(2): p. 617-26.
280. Helke, C.J. and A. Rabchevsky, *Axotomy alters putative neurotransmitters in visceral sensory neurons of the nodose and petrosal ganglia*. Brain Res, 1991. **551**(1-2): p. 44-51.
281. Katz, D.M., J.E. Adler, and I.B. Black, *Expression and regulation of tyrosine hydroxylase in adult sensory neurons in culture: effects of elevated potassium and nerve growth factor*. Brain Res, 1986. **385**(1): p. 68-73.
282. Xie, W., et al., *Highly localized interactions between sensory neurons and sprouting sympathetic fibers observed in a transgenic tyrosine hydroxylase reporter mouse*. Mol Pain, 2011. **7**: p. 53.
283. Herradon, G., et al., *Noradrenergic and opioidergic alterations in neuropathy in different rat strains*. Neurosci Lett, 2008. **438**(2): p. 186-9.
284. Merskey, H., *Logic, truth and language in concepts of pain*. Qual Life Res, 1994. **3 Suppl 1**: p. S69-76.
285. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.
286. Woolf, C.J. and Q. Ma, *Nociceptors--noxious stimulus detectors*. Neuron, 2007. **55**(3): p. 353-64.
287. Serra, J., *Overview of neuropathic pain syndromes*. Acta Neurol Scand Suppl, 1999. **173**: p. 7-11; discussion 48-52.
288. Merskey, H., *Variable meanings for the definition of disease*. J Med Philos, 1986. **11**(3): p. 215-32.
289. Karlsten, R. and T. Gordh, *How do drugs relieve neurogenic pain?* Drugs Aging, 1997. **11**(5): p. 398-412.
290. Woolf, C.J. and R.J. Mannion, *Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management*. Lancet, 1999. **353**(9168): p. 1959-64.
291. Mannion, R.J. and C.J. Woolf, *Pain mechanisms and management: a central perspective*. Clin J Pain, 2000. **16**(3 Suppl): p. S144-56.
292. Sherman, S.M. and R.W. Guillery, *Functional organization of thalamocortical relays*. J Neurophysiol, 1996. **76**(3): p. 1367-95.
293. Willis, W.D. and K.N. Westlund, *Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain*. J Clin Neurophysiol, 1997. **14**(1): p. 2-31.
294. Tracey, I. and P.W. Mantyh, *The cerebral signature for pain perception and its modulation*. Neuron, 2007. **55**(3): p. 377-91.
295. Cohen, S.P., *Cannabinoids for chronic pain*. BMJ, 2008. **336**(7637): p. 167-8.
296. Bouhassira, D., et al., *Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population*. Pain, 2008. **136**(3): p. 380-7.
297. Harker, J., et al., *Epidemiology of chronic pain in denmark and sweden*. Pain Res Treat, 2012. **2012**: p. 371248.

298. Treede, R.D., et al., *Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes*. *Neurology*, 2008. **70**(18): p. 1630-5.
299. Bouhassira, D. and N. Attal, *Translational neuropathic pain research: A clinical perspective*. *Neuroscience*, 2016.
300. Scholten, P.M. and R.N. Harden, *Assessing and Treating Patients With Neuropathic Pain*. *PM R*, 2015. **7**(11 Suppl): p. S257-69.
301. Bennett, M.I., *Paranoid psychosis due to flecainide toxicity in malignant neuropathic pain*. *Pain*, 1997. **70**(1): p. 93-4.
302. Baron, R., *Neuropathic pain: a clinical perspective*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(194): p. 3-30.
303. Baron, R., A. Binder, and G. Wasner, *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(8): p. 807-19.
304. Magrinelli, F., G. Zanette, and S. Tamburin, *Neuropathic pain: diagnosis and treatment*. *Pract Neurol*, 2013. **13**(5): p. 292-307.
305. Walker, A.K., et al., *Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(1): p. 80-101.
306. Lee, Y.C., N.J. Nassikas, and D.J. Clauw, *The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(2): p. 211.
307. Lee, Y.C., *Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis*. *Curr Rheumatol Rep*, 2013. **15**(1): p. 300.
308. Millan, M.J., *The induction of pain: an integrative review*. *Prog Neurobiol*, 1999. **57**(1): p. 1-164.
309. Backonja, M.M. and B.S. Galer, *Pain assessment and evaluation of patients who have neuropathic pain*. *Neurol Clin*, 1998. **16**(4): p. 775-90.
310. Hansson, P. and M. Haanpaa, *Diagnostic work-up of neuropathic pain: computing, using questionnaires or examining the patient?* *Eur J Pain*, 2007. **11**(4): p. 367-9.
311. Baron, R. and T.R. Tolle, *Assessment and diagnosis of neuropathic pain*. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2008. **2**(1): p. 1-8.
312. Bouhassira, D. and N. Attal, *Diagnosis and assessment of neuropathic pain: the saga of clinical tools*. *Pain*, 2011. **152**(3 Suppl): p. S74-83.
313. Brumovsky, P.R. and G.F. Gebhart, *Visceral organ cross-sensitization - an integrated perspective*. *Auton Neurosci*, 2010. **153**(1-2): p. 106-15.
314. Finnerup, N.B., S.H. Sindrup, and T.S. Jensen, *Recent advances in pharmacological treatment of neuropathic pain*. *F1000 Med Rep*, 2010. **2**: p. 52.
315. Dworkin, R.H., et al., *Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations*. *Pain*, 2007. **132**(3): p. 237-51.
316. Finnerup, N.B., et al., *Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet Neurol*, 2015. **14**(2): p. 162-73.
317. Wong, C.S., et al., *Diagnosis and management of neuropathic pain*. *Pain Manag*, 2014. **4**(3): p. 221-31.
318. Saulino, M., P.S. Kim, and E. Shaw, *Practical considerations and patient selection for intrathecal drug delivery in the management of chronic pain*. *J Pain Res*, 2014. **7**: p. 627-38.
319. Jain, K.K., *Cell therapy for pain*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. **8**(12): p. 1847-53.
320. Vadivelu, S., et al., *Potential role of stem cells for neuropathic pain disorders*. *Neurosurg Focus*, 2013. **35**(3): p. E11.
321. Franchi, S., et al., *Adult stem cell as new advanced therapy for experimental neuropathic pain treatment*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 470983.
322. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.

323. Kogler, G., et al., *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 123-35.
324. Nazarov, I., et al., *Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential*. Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(5): p. 359-72.
325. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
326. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
327. Lu, T., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from fetal bovine liver*. Cell Tissue Bank, 2014. **15**(3): p. 439-50.
328. Gong, X., et al., *Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells*. Cell Biol Int, 2014. **38**(4): p. 405-11.
329. Afsharimani, B., et al., *Pharmacological options for the management of refractory cancer pain- what is the evidence?* Support Care Cancer, 2015. **23**(5): p. 1473-81.
330. Lamprecht, A., et al., *Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment*. Int J Pharm, 2004. **278**(2): p. 407-14.
331. Liu, K.S., et al., *Novel depots of buprenorphine have a long-acting effect for the management of physical dependence to morphine*. J Pharm Pharmacol, 2006. **58**(3): p. 337-44.
332. Wang, J.J., et al., *The release and analgesic activities of morphine and its ester prodrug, morphine propionate, formulated by water-in-oil nanoemulsions*. J Drug Target, 2008. **16**(4): p. 294-301.
333. Soderquist, R.G., et al., *Release of plasmid DNA-encoding IL-10 from PLGA microparticles facilitates long-term reversal of neuropathic pain following a single intrathecal administration*. Pharm Res, 2010. **27**(5): p. 841-54.
334. Kim, S., et al., *Preparation of multivesicular liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1983. **728**(3): p. 339-48.
335. Mantripragada, S., *A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery*. Prog Lipid Res, 2002. **41**(5): p. 392-406.
336. Zhong, H., et al., *Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine*. Int J Pharm, 2005. **301**(1-2): p. 15-24.
337. Saraghi, M. and E.V. Hersh, *Three newly approved analgesics: an update*. Anesth Prog, 2013. **60**(4): p. 178-87.
338. Kim, S. and S.B. Howell, *Multivesicular liposomes having a biologically active substance encapsulated therein in the presence of a hydrochloride*. 1998, Google Patents.
339. Wall, P.D., et al., *Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa*. Pain, 1979. **7**(2): p. 103-11.
340. Brumovsky, P.R., et al., *Some lumbar sympathetic neurons develop a glutamatergic phenotype after peripheral axotomy with a note on VGLUT(2)-positive perineuronal baskets*. Exp Neurol, 2011. **230**(2): p. 258-72.
341. Bennett, G.J. and Y.K. Xie, *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*. Pain, 1988. **33**(1): p. 87-107.
342. Kruger, L., *Methods in Pain Research*. Frontiers in Neuroscience. 2001: CRC Press.
343. Suter, M.R., et al., *Perioperative nerve blockade: clues from the bench*. Anesthesiol Res Pract, 2011. **2011**: p. 124898.
344. McCarson, K.E., *Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat*. Curr Protoc Pharmacol, 2015. **70**: p. 5 4 1-9.
345. Herzog, E.L., L. Chai, and D.S. Krause, *Plasticity of marrow-derived stem cells*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3483-93.

346. Goel, R.K., et al., *Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve*. J Clin Neurosci, 2009. **16**(9): p. 1211-7.
347. Usach, V., et al., *Bone marrow mononuclear cells migrate to the demyelinated sciatic nerve and transdifferentiate into Schwann cells after nerve injury: attempt at a peripheral nervous system intrinsic repair mechanism*. J Neurosci Res, 2011. **89**(8): p. 1203-17.
348. Chaplan, S.R., et al., *Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw*. J Neurosci Methods, 1994. **53**(1): p. 55-63.
349. Dixon, W.J., *Efficient analysis of experimental observations*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980. **20**: p. 441-62.
350. Weinstein, S., *Tactile sensitivity of the phalanges*. Percept Mot Skills, 1962. **14**: p. 351-4.
351. Choi, Y., et al., *Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain*. Pain, 1994. **59**(3): p. 369-76.
352. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics*. Am J Clin Pathol, 1981. **75**(6): p. 816-21.
353. Seroogy, K.B., Herman J.P., *In situ hybridization approaches to the study of the nervous system, in Neurochemistry - a practical approach*, B.H.S. Turner A.J., Editor. 1997, Oxford University Press. p. 121-150.
354. Hemmerle, A.M., et al., *(+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") treatment modulates expression of neurotrophins and their receptors in multiple regions of adult rat brain*. J Comp Neurol, 2012. **520**(11): p. 2459-74.
355. Chime S.A., O.G.C., Onyishi I., *Kinetics and Mechanisms of Drug Release from Swellable and Non Swellable*

Matrices: A Review. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical

Sciences, 2013. **4**(2): p. 97-103.

356. Harrington, A.M., H. Olteanu, and S.H. Kroft, *A dissection of the CD45/side scatter "blast gate"*. Am J Clin Pathol, 2012. **137**(5): p. 800-4.
357. Chen, C.H., et al., *Injection of autologous bone marrow cells in hyaluronan hydrogel improves cardiac performance after infarction in pigs*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(7): p. H1078-86.
358. Setton-Avruj, C.P., et al., *Presence of alpha-globin mRNA and migration of bone marrow cells after sciatic nerve injury suggests their participation in the degeneration/regeneration process*. Exp Neurol, 2007. **203**(2): p. 568-78.
359. Shi, T.J., et al., *Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression*. Neuroscience, 2001. **105**(1): p. 249-63.
360. Tandrup, T., C.J. Woolf, and R.E. Coggeshall, *Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve*. J Comp Neurol, 2000. **422**(2): p. 172-80.
361. Vestergaard, S., T. Tandrup, and J. Jakobsen, *Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies*. J Comp Neurol, 1997. **388**(2): p. 307-12.
362. Li, J.L., et al., *Vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to coexpression*. J Comp Neurol, 2003. **463**(2): p. 212-20.
363. Landry, M., et al., *Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia*. J Comp Neurol, 2004. **468**(3): p. 380-94.
364. Brumovsky, P.R., et al., *Expression of vesicular glutamate transporters in sensory and autonomic neurons innervating the mouse bladder*. J Urol, 2013. **189**(6): p. 2342-9.

365. Morris, J.L., et al., *Most peptide-containing sensory neurons lack proteins for exocytotic release and vesicular transport of glutamate*. J Comp Neurol, 2005. **483**(1): p. 1-16.
366. Brumovsky, P., M. Watanabe, and T. Hokfelt, *Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury*. Neuroscience, 2007. **147**(2): p. 469-90.
367. Brumovsky, P.R., et al., *Expression of vesicular glutamate transporters type 1 and 2 in sensory and autonomic neurons innervating the mouse colorectum*. J Comp Neurol, 2011. **519**(16): p. 3346-66.
368. Scherrer, G., et al., *VGLUT2 expression in primary afferent neurons is essential for normal acute pain and injury-induced heat hypersensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(51): p. 22296-301.
369. Lou, S., et al., *Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-mechanoreceptors*. J Neurosci, 2013. **33**(3): p. 870-82.
370. Kaneko, T. and F. Fujiyama, *Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system*. Neurosci Res, 2002. **42**(4): p. 243-50.
371. Boulland, J.L., et al., *Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters*. J Comp Neurol, 2004. **480**(3): p. 264-80.
372. Herzog, E., et al., *Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus*. J Neurochem, 2006. **99**(3): p. 1011-8.
373. Li, J.L., et al., *Expression of vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat*. J Comp Neurol, 2003. **457**(3): p. 236-49.
374. Dittman, J.S. and W.G. Regehr, *Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to Purkinje cell synapse*. J Neurosci, 1998. **18**(16): p. 6147-62.
375. Llewellyn-Smith, I.J., et al., *VGLUT1 and VGLUT2 innervation in autonomic regions of intact and transected rat spinal cord*. J Comp Neurol, 2007. **503**(6): p. 741-67.
376. Kullander, K., et al., *Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking*. Science, 2003. **299**(5614): p. 1889-92.
377. Mann, M.D., *Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review*. Brain Behav Evol, 1973. **7**(1): p. 34-83.
378. Hughes, D.I., et al., *Peripheral axotomy induces depletion of the vesicular glutamate transporter VGLUT1 in central terminals of myelinated afferent fibres in the rat spinal cord*. Brain Res, 2004. **1017**(1-2): p. 69-76.
379. Du B.A., S.S.S., Bannatyne B.A., Jalczy S.M., Linnen S., Maxwell D.J., , *Neurotransmitter phenotypes of descending systems in the rat lumbar spinal cord*. Neuroscience, 2012(227): p. 67-79.
380. Gebre, S.A., S.L. Reeber, and R.V. Sillitoe, *Parasagittal compartmentation of cerebellar mossy fibers as revealed by the patterned expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2*. Brain Struct Funct, 2012. **217**(2): p. 165-80.
381. Sillitoe, R.V., M.W. Vogel, and A.L. Joyner, *Engrailed homeobox genes regulate establishment of the cerebellar afferent circuit map*. J Neurosci, 2010. **30**(30): p. 10015-24.
382. Meister, B., et al., *Glutamate transporter mRNA and glutamate-like immunoreactivity in spinal motoneurons*. Neuroreport, 1993. **5**(3): p. 337-40.
383. Waerhaug, O. and O.P. Ottersen, *Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry*. Anat Embryol (Berl), 1993. **188**(5): p. 501-13.

384. Maxwell, D.J., et al., *Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn*. J Physiol, 2007. **584**(Pt 2): p. 521-33.
385. Schneider, S.P. and T.M. Walker, *Morphology and electrophysiological properties of hamster spinal dorsal horn neurons that express VGLUT2 and enkephalin*. J Comp Neurol, 2007. **501**(5): p. 790-809.
386. Yasaka, T., et al., *Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach*. Pain, 2010. **151**(2): p. 475-88.
387. Graziano, A., et al., *Vesicular glutamate transporters define two sets of glutamatergic afferents to the somatosensory thalamus and two thalamocortical projections in the mouse*. J Comp Neurol, 2008. **507**(2): p. 1258-76.
388. Leo, S., et al., *Impairment of VGLUT2 but not VGLUT1 signaling reduces neuropathy-induced hypersensitivity*. Eur J Pain, 2009. **13**(10): p. 1008-17.
389. Lagerstrom, M.C., et al., *VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch*. Neuron, 2010. **68**(3): p. 529-42.
390. Liu, Y., et al., *VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch*. Neuron, 2010. **68**(3): p. 543-56.
391. Yang, C.Q., et al., *Vesicular glutamate transporter-3 contributes to visceral hyperalgesia induced by Trichinella spiralis infection in rats*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(4): p. 865-72.
392. Costigan, M., et al., *Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury*. BMC Neurosci, 2002. **3**: p. 16.
393. Xiao, H.S., et al., *Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8360-5.
394. Anseloni, V.C., et al., *Alterations in stress-associated behaviors and neurochemical markers in adult rats after neonatal short-lasting local inflammatory insult*. Neuroscience, 2005. **131**(3): p. 635-45.
395. Ren, K., et al., *Neonatal local noxious insult affects gene expression in the spinal dorsal horn of adult rats*. Mol Pain, 2005. **1**: p. 27.
396. Hökfelt T., Z.X., Villar M.J., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., *Central consequences of peripheral nerve damage*. 2013: Elsevier.
397. Smith, R.E., et al., *Vesicular glutamate transporter transcript expression in the thalamus in schizophrenia*. Neuroreport, 2001. **12**(13): p. 2885-7.
398. Kawasaki, A., et al., *Up-regulation of VGLUT2 expression in hypothalamic-neurohypophysial neurons of the rat following osmotic challenge*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(3): p. 672-80.
399. Kawano, M., et al., *Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain*. J Comp Neurol, 2006. **498**(5): p. 581-92.
400. Xu, Z.Q., T.J. Shi, and T. Hokfelt, *Expression of galanin and a galanin receptor in several sensory systems and bone anlage of rat embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14901-5.
401. Daniels, R.W., B.R. Miller, and A. DiAntonio, *Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration*. Neurobiol Dis, 2011. **41**(2): p. 415-20.
402. Kapadia, S.E. and C.C. LaMotte, *Deafferentation-induced alterations in the rat dorsal horn: I. Comparison of peripheral nerve injury vs. rhizotomy effects on presynaptic, postsynaptic, and glial processes*. J Comp Neurol, 1987. **266**(2): p. 183-97.
403. Zhang, X., et al., *Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord--III. Effects of peripheral axotomy with special reference to galanin*. Neuroscience, 1995. **64**(4): p. 893-915.

404. Agrawal, S.G. and R.H. Evans, *The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat*. Br J Pharmacol, 1986. **87**(2): p. 345-55.
405. Evans, R.H., et al., *A comparison of excitatory amino acid antagonists acting at primary afferent C fibres and motoneurons of the isolated spinal cord of the rat*. Br J Pharmacol, 1987. **91**(3): p. 531-7.
406. deGroot, J., S. Zhou, and S.M. Carlton, *Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation*. Neuroreport, 2000. **11**(3): p. 497-502.
407. Carlton, S.M., G.L. Hargett, and R.E. Coggeshall, *Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin*. Neurosci Lett, 1995. **197**(1): p. 25-8.
408. Jackson, D.L., et al., *Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats*. Eur J Pharmacol, 1995. **284**(3): p. 321-5.
409. Tian, Y.L., et al., *Local application of morphine suppresses glutamate-evoked activities of C and Adelta afferent fibers in rat hairy skin*. Brain Res, 2005. **1059**(1): p. 28-34.
410. Miller, K.E., et al., *Glutaminase immunoreactivity and enzyme activity is increased in the rat dorsal root ganglion following peripheral inflammation*. Pain Res Treat, 2012. **2012**: p. 414697.
411. Hoffman, E.M., R. Schechter, and K.E. Miller, *Fixative composition alters distributions of immunoreactivity for glutaminase and two markers of nociceptive neurons, Nav1.8 and TRPV1, in the rat dorsal root ganglion*. J Histochem Cytochem, 2010. **58**(4): p. 329-44.
412. Edwards, R.H., *The neurotransmitter cycle and quantal size*. Neuron, 2007. **55**(6): p. 835-58.
413. Featherstone, D.E., *Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond*. ACS Chem Neurosci, 2010. **1**(1): p. 4-12.
414. Hoffman, E.M. and K.E. Miller, *Peripheral inhibition of glutaminase reduces carrageenan-induced Fos expression in the superficial dorsal horn of the rat*. Neurosci Lett, 2010. **472**(3): p. 157-60.
415. Rogoz, K., et al., *VGLUT2-dependent glutamatergic transmission in primary afferents is required for intact nociception in both acute and persistent pain modalities*. Pain, 2012. **153**(7): p. 1525-36.
416. Rogoz, K., et al., *Multimodal use of calcitonin gene-related peptide and substance P in itch and acute pain uncovered by the elimination of vesicular glutamate transporter 2 from transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 neurons*. J Neurosci, 2014. **34**(42): p. 14055-68.
417. Boyce-Rustay, J.M., P. Honore, and M.F. Jarvis, *Animal Models of Acute and Chronic Inflammatory and Nociceptive Pain*, in *Analgesia. Methods and protocols*, A. Szallasi, Editor. 2010, Humana Press: New Jersey, USA. p. 41-46.
418. Lagerstrom, M.C., et al., *A sensory subpopulation depends on vesicular glutamate transporter 2 for mechanical pain, and together with substance P, inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5789-94.
419. Rogoz, K., et al., *VGLUT2 controls heat and punctuate hyperalgesia associated with nerve injury via TRPV1-Cre primary afferents*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0116568.
420. Rogoz, K., et al., *Glutamate, substance P, and calcitonin gene-related peptide cooperate in inflammation-induced heat hyperalgesia*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(2): p. 322-34.
421. Draxler, P., et al., *VGluT3(+) primary afferents play distinct roles in mechanical and cold hypersensitivity depending on pain etiology*. J Neurosci, 2014. **34**(36): p. 12015-28.
422. Herman, M.A., et al., *Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture*. J Neurosci, 2014. **34**(35): p. 11781-91.
423. Draxler, P., et al., *VGluT3(+) primary afferents play distinct roles in mechanical and cold hypersensitivity depending on pain etiology*. J. Neurosci., 2014. **34**(36): p. 12015-28.
424. Patodia, S. and G. Raivich, *Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration*. Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 8.

425. Tsujino, H., et al., *Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury*. Mol Cell Neurosci, 2000. **15**(2): p. 170-82.
426. Boeshore, K.L., et al., *Novel changes in gene expression following axotomy of a sympathetic ganglion: a microarray analysis*. J Neurobiol, 2004. **59**(2): p. 216-35.
427. Takeda, M., et al., *Ionotropic glutamate receptors expressed in human retinoblastoma Y79 cells*. Neurosci Lett, 2000. **294**(2): p. 97-100.
428. Peirce, C., et al., *Effect of injury on S1 dorsal root ganglia in an experimental model of neuropathic faecal incontinence*. Br J Surg, 2011. **98**(8): p. 1155-9.
429. Nakagomi, S., et al., *Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 5187-96.
430. Seiffers, R., C.D. Mills, and C.J. Woolf, *ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration*. J Neurosci, 2007. **27**(30): p. 7911-20.
431. Moro, F., et al., *Prevalence of pelvic adhesions on ultrasound examination in women with a history of Cesarean section*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015. **45**(2): p. 223-8.
432. ten Broek, R.P., et al., *Burden of adhesions in abdominal and pelvic surgery: systematic review and met-analysis*. BMJ, 2013. **347**: p. f5588.
433. Sulaiman, W. and T. Gordon, *Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application*. Ochsner J, 2013. **13**(1): p. 100-8.
434. Pastelin, C.F., et al., *Neural pathways of somatic and visceral reflexes of the external urethral sphincter in female rats*. J Comp Neurol, 2012. **520**(14): p. 3120-34.
435. Quinn, M.J., *Endometriosis: the consequence of uterine denervation-reinnervation*. Arch Gynecol Obstet, 2011. **284**(6): p. 1423-9.
436. Quinn, M., *Obstetric denervation-gynaecological reinnervation: disruption of the inferior hypogastric plexus in childbirth as a source of gynaecological symptoms*. Med Hypotheses, 2004. **63**(3): p. 390-3.
437. McMahon SB, P.J., *Nociceptor Plasticity*, in *The neurobiology of pain*, K.M. Hunt SP, Editor. 2005, Oxford Univ Press, Oxford. p. 35–64.
438. Brumovsky PR, V.M., Hökfelt T, *Retrograde cellular changes in primary afferent and sympathetic neurons after nerve injury*, in *Encyclopedia of Pain*, R.F.S. G.F. Gebhart, Editor. 2013, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 3407–3415.
439. Garry, M.G., et al., *Quantitative autoradiographic analysis of [125I]-human CGRP binding sites in the dorsal horn of rat following chronic constriction injury or dorsal rhizotomy*. Peptides, 1991. **12**(6): p. 1365-73.
440. Grundy, D., *Signalling the state of the digestive tract*. Auton Neurosci, 2006. **125**(1-2): p. 76-80.
441. Herrity, A.N., et al., *Identification of bladder and colon afferents in the nodose ganglia of male rats*. J Comp Neurol, 2014. **522**(16): p. 3667-82.
442. Huang, F.L., et al., *Peripheral deafferentation alters calcitonin gene-related peptide mRNA expression in visceral sensory neurons of the nodose and petrosal ganglia*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **22**(1-4): p. 290-8.
443. Caterina, M.J., *Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(1): p. R64-76.
444. Michael, G.J. and J.V. Priestley, *Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy*. J Neurosci, 1999. **19**(5): p. 1844-54.
445. Hudson, L.J., et al., *VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(11): p. 2105-14.

446. Fukuoka, T., et al., *VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation*. *Pain*, 2002. **99**(1-2): p. 111-20.
447. Biggs, J.E., et al., *Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury*. *Eur J Pain*, 2007. **11**(2): p. 192-201.
448. Kim, H.Y., et al., *Differential Changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury*. *J Pain*, 2008. **9**(3): p. 280-8.
449. Zakir, H.M., et al., *Expression of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e44023.
450. Li, L., et al., *The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons*. *Cell*, 2011. **147**(7): p. 1615-27.
451. Brumovsky, P.R., *VGLUTs in Peripheral Neurons and the Spinal Cord: Time for a Review*. *ISRN Neurol*, 2013. **2013**: p. 829753.
452. Hu, P., et al., *Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve*. *Brain Behav Immun*, 2007. **21**(5): p. 599-616.
453. Kataoka, K., M. Kanje, and L.B. Dahlin, *Induction of activating transcription factor 3 after different sciatic nerve injuries in adult rats*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2007. **41**(4): p. 158-66.
454. Linda, H., M.K. Skold, and T. Ochsmann, *Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury*. *Front Neurol*, 2011. **2**: p. 30.
455. Peddie, C.J. and J.R. Keast, *Pelvic Nerve Injury Causes a Rapid Decrease in Expression of Choline Acetyltransferase and Upregulation of c-Jun and ATF-3 in a Distinct Population of Sacral Preganglionic Neurons*. *Front Neurosci*, 2011. **5**: p. 6.
456. Van der Horst, V.G. and G. Holstege, *Sensory and motor components of reproductive behavior: pathways and plasticity*. *Behav Brain Res*, 1998. **92**(2): p. 157-67.
457. Corder, G., et al., *A novel method to quantify histochemical changes throughout the mediolateral axis of the substantia gelatinosa after spared nerve injury: characterization with TRPV1 and substance P*. *J Pain*, 2010. **11**(4): p. 388-98.
458. Valtschanoff, J.G., et al., *Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn*. *J Comp Neurol*, 2001. **436**(2): p. 225-35.
459. Gibson, S.J., et al., *Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species*. *J Neurosci*, 1984. **4**(12): p. 3101-11.
460. Chung, K., W.T. Lee, and S.M. Carlton, *The effects of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn*. *Neurosci Lett*, 1988. **90**(1-2): p. 27-32.
461. Traub, R.J., M.J. Iadarola, and M.A. Ruda, *Effect of multiple dorsal rhizotomies on calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the lumbosacral dorsal spinal cord of the cat: a radioimmunoassay analysis*. *Peptides*, 1989. **10**(5): p. 979-83.
462. Spicarova, D., V. Nerandzic, and J. Palecek, *Update on the role of spinal cord TRPV1 receptors in pain modulation*. *Physiol Res*, 2014. **63 Suppl 1**: p. S225-36.
463. Ferrini, F., et al., *Modulation of inhibitory neurotransmission by the vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in organotypically cultured mouse substantia gelatinosa neurons*. *Pain*, 2010. **150**(1): p. 128-40.
464. Kim, Y.H., et al., *TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord*. *Neuron*, 2012. **74**(4): p. 640-7.
465. Doly, S., et al., *The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes*. *Neurosci Lett*, 2004. **357**(2): p. 123-6.
466. Zhou, H.Y., et al., *The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn*. *J Neurochem*, 2009. **108**(1): p. 305-18.

467. Doly, S., J. Fischer, and M. Conrath, *The vanilloid receptor-1 (TRPV1) is expressed in some rat dorsal horn NK1 cells*. Brain Res, 2004. **1004**(1-2): p. 203-7.
468. Gyang, A.N., et al., *Managing chronic pelvic pain following reconstructive pelvic surgery with transvaginal mesh*. Int Urogynecol J, 2014. **25**(3): p. 313-8.
469. Antolak, S.J., Jr., et al., *Anatomical basis of chronic pelvic pain syndrome: the ischial spine and pudendal nerve entrapment*. Med Hypotheses, 2002. **59**(3): p. 349-53.
470. Fisher, H.W. and P.M. Lotze, *Nerve injury locations during retropubic sling procedures*. Int Urogynecol J, 2011. **22**(4): p. 439-41.
471. Baca, V., et al., *Pudendal nerve in pelvic bone fractures*. Injury, 2013. **44**(7): p. 952-6.
472. Gerbershagen, H.J., et al., *Chronic pain and disability after pelvic and acetabular fractures--assessment with the Mainz Pain Staging System*. J Trauma, 2010. **69**(1): p. 128-36.
473. Brandsborg, B., et al., *Risk factors for chronic pain after hysterectomy: a nationwide questionnaire and database study*. Anesthesiology, 2007. **106**(5): p. 1003-12.
474. Nikolajsen, L., et al., *Chronic pain following Caesarean section*. Acta Anaesthesiol Scand, 2004. **48**(1): p. 111-6.
475. Eisenach, J.C., et al., *Resolution of pain after childbirth*. Anesthesiology, 2013. **118**(1): p. 143-51.
476. Hannah, M.E., et al., *Maternal outcomes at 2 years after planned cesarean section versus planned vaginal birth for breech presentation at term: the international randomized Term Breech Trial*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(3): p. 917-27.
477. Macrae, W.A., *Chronic post-surgical pain: 10 years on*. Br J Anaesth, 2008. **101**(1): p. 77-86.
478. Brandsborg, B., et al., *Mechanosensitivity before and after hysterectomy: a prospective study on the prediction of acute and chronic postoperative pain*. Br J Anaesth, 2011. **107**(6): p. 940-7.
479. Bruce, J. and Z.H. Krukowski, *Quality of life and chronic pain four years after gastrointestinal surgery*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(9): p. 1362-70.
480. Burke, S. and G.D. Shorten, *When pain after surgery doesn't go away*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 1): p. 318-22.
481. Duale, C., et al., *Neuropathic aspects of persistent postsurgical pain: a French multicenter survey with a 6-month prospective follow-up*. J Pain, 2014. **15**(1): p. 24 e1-24 e20.
482. Kehlet, H., T.S. Jensen, and C.J. Woolf, *Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention*. Lancet, 2006. **367**(9522): p. 1618-25.
483. Possover, M. and N. Lemos, *Risks, symptoms, and management of pelvic nerve damage secondary to surgery for pelvic organ prolapse: a report of 95 cases*. Int Urogynecol J, 2011. **22**(12): p. 1485-90.
484. Reddi, D. and N. Curran, *Chronic pain after surgery: pathophysiology, risk factors and prevention*. Postgrad Med J, 2014. **90**(1062): p. 222-7; quiz 226.
485. Bouman, E.A., et al., *Reduced incidence of chronic postsurgical pain after epidural analgesia for abdominal surgery*. Pain Pract, 2014. **14**(2): p. E76-84.
486. Collins, S.A., et al., *Pain management strategies for urogynecologic surgery: a review*. Female Pelvic Med Reconstr Surg, 2014. **20**(6): p. 310-5.
487. Ducic, I., M. Moxley, and A. Al-Attar, *Algorithm for treatment of postoperative incisional groin pain after cesarean delivery or hysterectomy*. Obstet Gynecol, 2006. **108**(1): p. 27-31.
488. Cervero, F. and J.M. Laird, *Visceral pain*. Lancet, 1999. **353**(9170): p. 2145-8.
489. Blichfeldt-Eckhardt, M.R., et al., *Early visceral pain predicts chronic pain after laparoscopic cholecystectomy*. Pain, 2014. **155**(11): p. 2400-7.
490. Landau, R., L. Bollag, and C. Ortner, *Chronic pain after childbirth*. Int J Obstet Anesth, 2013. **22**(2): p. 133-45.
491. Lavand'homme, P., *Chronic pain after childbirth*. Curr Opin Anaesthesiol, 2013. **26**(3): p. 273-7.

492. Martellucci, J., G. Naldini, and A. Carriero, *Sacral nerve modulation in the treatment of chronic pelvic pain*. *Int J Colorectal Dis*, 2012. **27**(7): p. 921-6.
493. Xu, X.J., et al., *The effects of intrathecal neuropeptide Y on the spinal nociceptive flexor reflex in rats with intact sciatic nerves and after peripheral axotomy*. *Neuroscience*, 1994. **63**(3): p. 817-26.
494. Xu, I.S., et al., *The effect of intrathecal selective agonists of Y1 and Y2 neuropeptide Y receptors on the flexor reflex in normal and axotomized rats*. *Brain Res*, 1999. **833**(2): p. 251-7.
495. Mahinda, T.B. and B.K. Taylor, *Intrathecal neuropeptide Y inhibits behavioral and cardiovascular responses to noxious inflammatory stimuli in awake rats*. *Physiol Behav*, 2004. **80**(5): p. 703-11.
496. Taylor, B.K., et al., *Inflammation enhances Y1 receptor signaling, neuropeptide Y-mediated inhibition of hyperalgesia, and substance P release from primary afferent neurons*. *Neuroscience*, 2014. **256**: p. 178-94.
497. Intondi, A.B., et al., *Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain*. *Pain*, 2008. **137**(2): p. 352-65.
498. Yalamuri, S.M., T.J. Brennan, and C.M. Spofford, *Neuropeptide Y is analgesic in rats after plantar incision*. *Eur J Pharmacol*, 2013. **698**(1-3): p. 206-12.
499. Wiley, R.G., L.L. Lemons, and R.H.t. Kline, *Neuropeptide Y receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociceptive reflex responses to heat and formalin*. *Neuroscience*, 2009. **161**(1): p. 139-47.
500. Lemons, L.L. and R.G. Wiley, *Neuropeptide Y receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociceptive reflex and operant responses to aversive cold after CFA inflammation*. *Neuroscience*, 2012. **216**: p. 158-66.
501. Jazin, E.E., et al., *Expression of peptide YY and mRNA for the NPY/PYY receptor of the Y1 subtype in dorsal root ganglia during rat embryogenesis*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1993. **76**(1): p. 105-13.
502. Wahlestedt, C., N. Yanaihara, and R. Hakanson, *Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides*. *Regul Pept*, 1986. **13**(3-4): p. 307-18.
503. Moran, T.D., W.F. Colmers, and P.A. Smith, *Opioid-like actions of neuropeptide Y in rat substantia gelatinosa: Y1 suppression of inhibition and Y2 suppression of excitation*. *J Neurophysiol*, 2004. **92**(6): p. 3266-75.
504. Melnick, I.V., *Cell type-specific postsynaptic effects of neuropeptide Y in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord*. *Synapse*, 2012. **66**(7): p. 640-9.
505. Martire, M., et al., *K(+)-Evoked [(3)H]D-aspartate release in rat spinal cord synaptosomes: modulation by neuropeptide Y and calcium channel antagonists*. *J Neurosci Res*, 2000. **62**(5): p. 722-9.
506. Coull, J.A., et al., *Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain*. *Nature*, 2003. **424**(6951): p. 938-42.
507. Coull, J.A., et al., *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain*. *Nature*, 2005. **438**(7070): p. 1017-21.
508. Chery, N. and Y. de Koninck, *Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord*. *J Neurosci*, 1999. **19**(17): p. 7342-55.
509. Todd, A.J., et al., *Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord*. *J Neurosci*, 1996. **16**(3): p. 974-82.
510. Polgar, E., et al., *GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord*. *J Neurosci*, 1999. **19**(7): p. 2637-46.

511. Arcila Quiceno, V.H., Conde Cotes, C.A., Nieto Pico, J.E., Garcia Prada, F.H. , *Comparison of hematology reference values of strain wistar/UIS (Rattus norvegicus) with parameters established in standards laboratories*. Spei Domus, 2010: p. 12:45-51.
512. Perkins, N.M. and D.J. Tracey, *Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils*. Neuroscience, 2000. **101**(3): p. 745-57.
513. DeFrancesco-Lisowitz, A., et al., *The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system*. Neuroscience, 2015. **302**: p. 174-203.
514. Coronel, M.F., et al., *Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury*. Neurosci Lett, 2008. **444**(1): p. 69-73.
515. Vogelaar, C.F., et al., *Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome*. Brain Res, 2004. **1027**(1-2): p. 67-72.
516. Naruse, K., et al., *Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27458.
517. Anjamrooz, S.H., *Cell memory-based therapy*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(11): p. 2682-9.
518. Guo, W., et al., *Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain*. Stem Cells, 2011. **29**(8): p. 1294-303.
519. Siniscalco, D., et al., *Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice*. Front Integr Neurosci, 2011. **5**: p. 79.
520. Chen, G., et al., *Intrathecal bone marrow stromal cells inhibit neuropathic pain via TGF-beta secretion*. J Clin Invest, 2015. **125**(8): p. 3226-40.
521. Musolino, P.L., et al., *Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction*. Neurosci Lett, 2007. **418**(1): p. 97-101.
522. Orozco, L., et al., *Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study*. Transplantation, 2011. **92**(7): p. 822-8.
523. Vega, A., et al., *Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial*. Transplantation, 2015. **99**(8): p. 1681-90.
524. Zhang, S., et al., *Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo*. Circulation, 2004. **110**(25): p. 3803-7.
525. Yin, Y., et al., *Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration*. J Neurosci, 2003. **23**(6): p. 2284-93.
526. Barbosa da Fonseca, L.M., et al., *Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial delivery in a patient with chronic stroke*. Circulation, 2009. **120**(6): p. 539-41.
527. Zaverucha-do-Valle, C., et al., *Bone marrow mononuclear cells increase retinal ganglion cell survival and axon regeneration in the adult rat*. Cell Transplant, 2011. **20**(3): p. 391-406.
528. Coronel, M.F., P.L. Musolino, and M.J. Villar, *Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction*. Neurosci Lett, 2006. **405**(1-2): p. 5-9.
529. Garg, S., et al., *Bone marrow transplantation helps restore the intestinal mucosal barrier after total body irradiation in mice*. Radiat Res, 2014. **181**(3): p. 229-39.
530. Prockop, D.J., *"Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs)*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(3): p. 241-3.
531. Xiao, C., et al., *Sustained release of cisplatin from multivesicular liposomes: potentiation of antitumor efficacy against S180 murine carcinoma*. J Pharm Sci, 2004. **93**(7): p. 1718-24.

532. Chamberlain, M.C., et al., *Treatment of leptomeningeal metastasis with intraventricular administration of depot cytarabine (DTC 101). A phase I study.* Arch Neurol, 1993. **50**(3): p. 261-4.
533. Katre, N.V., et al., *Multivesicular liposome (DepoFoam) technology for the sustained delivery of insulin-like growth factor-I (IGF-I).* J Pharm Sci, 1998. **87**(11): p. 1341-6.
534. Mantripragada B. Sankaram, S.K., *Preparation of multivesicular liposomes for controlled release of encapsulated biologically active substances*, S. Inc., Editor. 1999.
535. Kim, T., et al., *Sustained-release morphine for epidural analgesia in rats.* Anesthesiology, 1996. **85**(2): p. 331-8.
536. Kim, T., J. Kim, and S. Kim, *Extended-release formulation of morphine for subcutaneous administration.* Cancer Chemother Pharmacol, 1993. **33**(3): p. 187-90.
537. Carvalho, B., et al., *Single-dose, extended-release epidural morphine (DepoDur) compared to conventional epidural morphine for post-cesarean pain.* Anesth Analg, 2007. **105**(1): p. 176-83.
538. Li, H., et al., *Multivesicular liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor.* Arch Pharm Res, 2005. **28**(8): p. 988-94.
539. Sun, L., et al., *Multivesicular liposomes for sustained release of naltrexone hydrochloride: design, characterization and in vitro/in vivo evaluation.* Pharm Dev Technol, 2013. **18**(4): p. 828-33.
540. Kumar, A., et al., *Clonidine for management of chronic pain: A brief review of the current evidences.* Saudi J Anaesth, 2014. **8**(1): p. 92-6.
541. Smith, H.S., et al., *Intrathecal drug delivery.* Pain Physician, 2008. **11**(2 Suppl): p. S89-S104.
542. Alam, M. and C.T. Hartrick, *Extended-release epidural morphine (DepoDur): an old drug with a new profile.* Pain Pract, 2005. **5**(4): p. 349-53.
543. Gambling, D., et al., *A comparison of Depodur, a novel, single-dose extended-release epidural morphine, with standard epidural morphine for pain relief after lower abdominal surgery.* Anesth Analg, 2005. **100**(4): p. 1065-74.
544. Ver Donck, A., et al., *Intrathecal drug administration in chronic pain syndromes.* Pain Pract, 2014. **14**(5): p. 461-76.
545. Stafford, M.A., P. Peng, and D.A. Hill, *Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management.* Br J Anaesth, 2007. **99**(4): p. 461-73.
546. Hughes, J., J.P. Hatcher, and I.P. Chessell, *Biologic drugs for analgesia: redefining the opportunity.* Curr Pharm Biotechnol, 2011. **12**(10): p. 1660-70.
547. Raffa, R.B., J.V. Pergolizzi, Jr., and R.J. Tallarida, *The determination and application of fixed-dose analgesic combinations for treating multimodal pain.* J Pain, 2010. **11**(8): p. 701-9.
548. Raffa, R.B., *Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain.* J Clin Pharm Ther, 2001. **26**(4): p. 257-64.
549. Mao, J., M.S. Gold, and M.M. Backonja, *Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies.* J Pain, 2011. **12**(2): p. 157-66.
550. Brain, S.D. and H.M. Cox, *Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets.* Br J Pharmacol, 2006. **147** Suppl 1: p. S202-11.
551. Cohen, S.P. and J. Mao, *Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications.* BMJ, 2014. **348**: p. f7656.
552. von Hehn, C.A., R. Baron, and C.J. Woolf, *Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms.* Neuron, 2012. **73**(4): p. 638-52.
553. Naito, Y., et al., *Tissue engineering in the vasculature.* Anat Rec (Hoboken), 2014. **297**(1): p. 83-97.
554. Yao, M., et al., *Repair of Rat Sciatic Nerve Defects by Using Allogeneic Bone Marrow Mononuclear Cells Combined With Chitosan/Silk Fibroin Scaffold.* Cell Transplant, 2016. **25**(5): p. 983-93.

555. Taguchi, A., et al., *Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients*. *Stem Cells Dev*, 2015. **24**(19): p. 2207-18.
556. Rosland, G.V., et al., *Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation*. *Cancer Res*, 2009. **69**(13): p. 5331-9.