



UNIVERSIDAD
AUSTRAL

Facultad de Ciencias Biomédicas

**Neuropatía y dolor inducidos por oxaliplatino:
estudio de los mecanismos involucrados,
análisis de diferencias asociadas al sexo y
evaluación de los efectos del resveratrol**

**Tesis doctoral
Lic. Constanza Agata Miguel**

Directora de tesis: Dra. María Florencia Coronel
Co-Director de tesis: Dr. Marcelo José Villar

Lugar: Instituto de Investigaciones en Medicina
Traslacional CONICET – Universidad Austral

Buenos Aires, Argentina
2025

Resumen

La **neuropatía periférica inducida por quimioterapia** (NPIQ) es un efecto adverso frecuente y severo del tratamiento antitumoral. En pacientes tratados con **oxaliplatino**, agente utilizado en el manejo de tumores colorrectales, gastroesofágicos y pancreáticos, la incidencia de neuropatía oscila entre el 60% y el 80%. Los síntomas incluyen manifestaciones motoras, autonómicas y, predominantemente, sensitivas. Entre estas últimas, se destacan la pérdida de sensibilidad a estímulos inocuos y el desarrollo de parestesias, disestesias y dolor neuropático que afectan principalmente manos, pies y región orofaríngea.

Se ha descrito que los **efectos neurotóxicos** de los quimioterápicos impactan principalmente a las neuronas aferentes primarias, localizadas en los ganglios anexos a la raíz dorsal. Sin embargo, los mecanismos subyacentes al daño neuronal y a la generación de dolor aún no están completamente esclarecidos. Por otra parte, estudios recientes han identificado **diferencias asociadas al sexo** en los mecanismos que participan en la generación de dolor persistente luego de lesiones del sistema nervioso. Sin embargo, estas diferencias no han sido aún exploradas en modelos de NPIQ.

En el ámbito clínico, algunos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la identificación de **factores de riesgo** para el desarrollo de neuropatía y dolor con el objetivo de estratificar pacientes y aplicar estrategias preventivas. Sin embargo, los hallazgos hasta la fecha han sido inconclusos o contradictorios. Además, no se han identificado **estrategias preventivas** efectivas, y los tratamientos sintomáticos disponibles, especialmente para el manejo del dolor, presentan eficacia limitada. La reducción de la dosis del antineoplásico es la única estrategia disponible para mitigar la NPIQ, lo que compromete el control tumoral.

En este contexto, el **objetivo de esta Tesis Doctoral** estudiar la prevalencia, características clínicas y mecanismos subyacentes a la neuropatía inducida por oxaliplatino, con especial foco en el desarrollo de dolor, analizando diferencias asociadas al sexo y estrategias preventivas y terapéuticas.

Para ello, en primer lugar, se evaluaron los procesos que intervienen en el daño neurotóxico de las neuronas aferentes primarias y las alteraciones conductuales desencadenadas por la administración de oxaliplatino utilizando un modelo experimental (Proyecto I). Luego analizamos si las alteraciones funcionales y los procesos neurotóxicos presentaban características diferenciales en machos y hembras (Proyecto II). A continuación, evaluamos si la administración de resveratrol lograba ejercer acciones neuroprotectoras y reducir las alteraciones conductuales y moleculares inducidas por el antineoplásico, sin interferir con sus efectos antitumorales (Proyecto III). Finalmente, evaluamos una cohorte local de pacientes oncológicos tratados con oxaliplatino y analizamos la prevalencia y severidad de la NPIQ, la existencia de diferencias asociadas al sexo y el impacto de factores asociados a riesgo (Proyecto IV).

Los animales (ratas macho Sprague Dawley) tratados con oxaliplatino (**Proyecto I**) mostraron una disminución significativa en los umbrales nociceptivos, manifestada como hipersensibilidad y alodinia mecánica y térmica fría. También mostraron una atenuación del

crecimiento, sin detectarse cambios en la postura, el acicalamiento o la actividad locomotora. En el nervio ciático se observaron niveles elevados de TBARS, marcador de peroxidación lipídica, y una menor relación glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG). En los ganglios raquídeos detectamos mayores niveles de TBARS y del factor neurotrófico NGF, involucrado en la modulación de la neurotransmisión nociceptiva, mientras que en la médula espinal observamos un incremento en la expresión de HMGB1, molécula que participa en la comunicación entre células dañadas y células inmunes. También se evidenció un aumento significativo en los niveles de ARNm de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la proteína adaptadora de unión al calcio 1 (IBA-1), el factor de transcripción NFκB, la interleuquina 1 beta (IL-1β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), tanto en los ganglios raquídeos lumbares como en la médula espinal dorsal. Los cambios detectados a nivel del mensajero se correlacionaron con cambios en la expresión proteica de GFAP e IBA-1, detectándose aumento en la señal inmunoreactiva para ambos marcadores. Finalmente, se observó un incremento en la expresión del factor activador de la transcripción 3 (ATF3), marcador de daño neuronal, en los ganglios raquídeos lumbares, y del factor de transcripción c-fos, sugestivo de hiperactividad neuronal, en la médula espinal.

Cuando analizamos si las alteraciones funcionales desencadenadas por oxaliplatino presentaban características diferenciales en ratas hembra (**Proyecto II**), observamos que la hipersensibilidad / alodinia mecánica fue comparable a la observada en machos. Sin embargo, la hipersensibilidad / alodinia térmica fría fue más severa en las hembras. Identificamos una sobreexpresión de diversos canales catiónicos de la familia de receptores de potencial transitorio (TRPs) involucrados en la detección de estímulos térmicos, químicos y mecánicos, en particular TRPV1, TRPM8 y TRPA1, en los ganglios raquídeos de animales de ambos sexos. Sin embargo, mientras que la magnitud del incremento de TRPV1 y TRPA1 fue similar en machos y hembras, el incremento de TRPM8, involucrado en la detección de frío inocuo, resultó significativamente mayor en hembras. También detectamos ciertas diferencias asociadas al sexo en los cambios desencadenados por oxaliplatino en el sistema endocannabinoide, incluyendo una reducción del 2-araquidonoil glicerol (2AG) en machos y de anadamida (AEA) en hembras. Los niveles de expresión de los receptores CB1 y CB2 se incrementaron en ambos sexos. Al igual que en machos, detectamos en ratas hembra un aumento en la inmunoreactividad para GFAP, tanto en los ganglios como en la médula. Sin embargo, no identificamos cambios en la intensidad de la señal inmunoreactiva para IBA-1, a nivel espinal. Además, si bien los niveles de ARNm de GFAP e IBA-1 aumentaron en los ganglios raquídeos de animales de ambos sexos, el incremento de GFAP fue mayor en machos, mientras que el de IBA-1 resultó mayor en hembras, indicando la existencia de cierto dimorfismo sexual también en la activación de células gliales / inmunes.

Para evaluar los efectos neuroprotectores del polifenol natural resveratrol (**Proyecto III**), se administró oxaliplatino a ratas macho, que también recibieron resveratrol por vía oral, siguiendo esquemas preventivos (administración diaria antes, durante y después del ciclo quimioterápico) o terapéuticos (administración diaria iniciada luego de finalizado el ciclo de quimioterapia). Los animales inyectados con oxaliplatino y aquellos que recibieron oxaliplatino y resveratrol en esquema terapéutico desarrollaron alodinia mecánica y térmica fría. Sin embargo, aquellos que recibieron resveratrol en esquema preventivo mostraron patrones de respuesta comparables a los de animales control. A nivel molecular, la administración temprana y sostenida de resveratrol indujo la sobreexpresión del factor de

transcripción Nrf2, principal regulador del sistema de defensa antioxidante, junto con las enzimas antioxidantes NQO-1 y HO-1 y la desacetilasa sensible a redox SIRT1. Asimismo, el tratamiento con resveratrol restauró los niveles de TBARS y normalizó la relación GSH/GSSG, marcadores clave del equilibrio redox celular. Finalmente, el polifenol logró prevenir el incremento inducido por el oxaliplatino en la inmunoreactividad de GFAP e IBA-1, así como en la expresión de NFκB, TNFα, ATF3 y c-fos, que se mantuvieron en niveles similares a los detectados en animales controles. Además, la administración oral de resveratrol no interfirió con las acciones antitumorales del oxaliplatino, ya que el quimioterápico logró mantener el control tumoral en ratones inoculados con células CT26, línea derivada de carcinoma colorrectal.

Finalmente, al estudiar una cohorte de pacientes con carcinoma colorrectal tratados con oxaliplatino (**Proyecto IV**), identificamos síntomas compatibles con NPIQ en el 73% de los mismos. La prevalencia fue mayor en mujeres (88%) que en hombres (60%), identificándose una asociación significativa entre el sexo femenino y el desarrollo del cuadro de neurotoxicidad. No se encontraron asociaciones significativas con otros factores como edad, sobrepeso, estadio tumoral, esquema quimioterápico y dosis acumulada. En la cohorte completa, solo se detectaron diferencias asociadas al sexo en la prevalencia de sobrepeso, siendo mayor en hombres. En el subgrupo de pacientes con NPIQ, también los hombres presentaron mayor prevalencia de sobrepeso y recibieron dosis acumuladas más altas. La severidad del cuadro pareciera ser mayor en hombres, ya que un mayor porcentaje debió reducir la dosis de oxaliplatino.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral contribuyen a la comprensión de los **mecanismos celulares y moleculares** involucrados en la neuropatía inducida por oxaliplatino, así como a la caracterización de las conductas asociadas a dolor neuropático. Se identificaron al estrés oxidativo y a la activación glial en ganglios raquídeos y médula espinal como procesos centrales en la neurotoxicidad inducida por el fármaco y en la génesis del dolor. Asimismo, se hallaron **diferencias significativas asociadas al sexo** en la manifestación de los síntomas, tanto a nivel preclínico como en pacientes, así como diferencias entre machos y hembras en la activación de células y mediadores inflamatorios y gliales, y en la modulación de sistemas clave como los canales TRP y el sistema endocannabinoide. Estos hallazgos reafirman la importancia de incorporar sistemáticamente la variable sexo en el diseño y análisis de estudios preclínicos y clínicos sobre neuropatía inducida por quimioterapia. Además, se comprobó que la administración preventiva de **resveratrol ejerce efectos neuroprotectores** relevantes, a través de la activación del sistema antioxidante endógeno, la atenuación del daño oxidativo y la modulación de procesos neuroinmunes, logrando reducir las conductas indicativas de dolor sin comprometer la eficacia antitumoral del tratamiento. Estos resultados abren nuevas perspectivas para el diseño racional de abordajes terapéuticos eficaces, seguros y personalizados para la neuropatía inducida por quimioterapia.

Abstract

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a frequent and severe adverse effect of anticancer treatment. In patients treated with oxaliplatin—an agent widely used in the management of colorectal, gastroesophageal, and pancreatic cancers—neuropathy develops in 60–80% of individuals. Symptoms include motor and autonomic alterations, but predominantly sensory disturbances. These sensory symptoms range from the loss of sensitivity to innocuous stimuli to the development of paresthesias, dysesthesias, and persistent neuropathic pain affecting mainly the hands, feet, and oropharyngeal region.

The **neurotoxic effects** of chemotherapeutic agents are known to primarily affect primary afferent neurons, whose cell bodies reside in the dorsal root ganglia (DRG). However, the precise mechanisms underlying neuronal injury and the development of pain remain incompletely understood. In parallel, recent studies have identified **sex-related differences** in the mechanisms mediating persistent pain after nervous system injuries, though such differences remain largely unexplored in models of CIPN.

Clinically, some research groups have focused on identifying **risk factors** for the development of neuropathy and pain to stratify patients and implement preventive strategies. However, findings to date have been inconclusive or contradictory. Moreover, no effective **preventive interventions** have been developed, and current symptomatic treatments—particularly for pain—show limited efficacy. The only viable strategy to mitigate CIPN involves dose reduction or discontinuation of the chemotherapeutic agent, thereby compromising cancer control.

In this context, the **main aim of this doctoral thesis** was to investigate the prevalence, clinical presentation and underlying mechanisms of oxaliplatin-induced neuropathy, with a special focus on pain development, examining sex-related differences as well as preventive and therapeutic strategies.

First, we investigated the mechanisms involved in the neurotoxic damage of primary afferent neurons and the behavioral alterations induced by oxaliplatin administration, by using an animal model (Project I). We then analyzed whether functional alterations and neurotoxic processes differed between males and females (Project II). Subsequently, we evaluated whether resveratrol administration could exert neuroprotective actions and reduce oxaliplatin-induced molecular and behavioral alterations without interfering with its antitumor effects (Project III). Finally, we evaluated a local cohort of oncology patients treated with oxaliplatin and analyzed CIPN prevalence and severity, the existence of sex-related differences and the impact of risk-associated factors (Project IV).

Male Sprague Dawley rats treated with oxaliplatin (**Project I**) exhibited a significant reduction in nociceptive thresholds, evidenced by mechanical and cold allodynia/hypersensitivity. They also displayed growth attenuation, although no changes in posture, grooming, or locomotor activity were observed. In the sciatic nerve, we detected elevated levels of TBARS, a marker of lipid peroxidation, and a reduced GSH/GSSG ratio. In the DRG, increased levels of TBARS and nerve growth factor (NGF)—a modulator of nociceptive transmission—were observed. In the spinal cord, HMGB1 expression was upregulated, a molecule involved in communication

between damaged and immune cells. Additionally, mRNA levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA-1), the transcription factor NFκB, interleukin-1β (IL-1β), and tumor necrosis factor alpha (TNFα) were significantly increased in both lumbar DRG and dorsal spinal cord. These transcriptional changes correlated with elevated GFAP and IBA-1 protein expression, as shown by increased immunoreactivity for both markers. We also observed increased expression of activating transcription factor 3 (ATF3), a marker of neuronal injury, in the DRG, and c-fos, indicative of neuronal hyperactivity, in the spinal cord.

When we investigated whether oxaliplatin-induced functional changes differed in female rats (**Project II**), we found that mechanical allodynia/hypersensitivity was similar to that in males, whereas cold allodynia was more severe in females. We identified overexpression of several transient receptor potential (TRP) channels—TRPV1, TRPM8, and TRPA1—in the DRG of both sexes. While the magnitude of TRPV1 and TRPA1 upregulation was comparable between sexes, TRPM8 (involved in innocuous cold sensation) expression was significantly higher in females. We also detected sex-dependent differences in oxaliplatin-induced alterations in the endocannabinoid system, including a reduction in 2-arachidonoyl glycerol (2AG) in males and in anandamide (AEA) in females. CB1 and CB2 receptor expression was increased in both sexes. As in males, GFAP immunoreactivity was increased in female DRG and spinal cord; however, no changes in IBA-1 signal intensity were observed at the spinal level. Although mRNA levels of both GFAP and IBA-1 were elevated in DRG from both sexes, GFAP upregulation was more pronounced in males, while IBA-1 expression was higher in females, indicating sex-specific differences in glial activation.

To evaluate the neuroprotective effects of resveratrol (**Project III**), oxaliplatin was administered to male rats alongside daily oral resveratrol using either a preventive (before, during, and after chemotherapy) or therapeutic (after chemotherapy) protocol. Animals receiving oxaliplatin alone or in combination with resveratrol in the therapeutic scheme developed mechanical and cold allodynia. However, those treated with resveratrol in the preventive scheme showed responses comparable to controls. At the molecular level, early and sustained resveratrol administration induced overexpression of the transcription factor Nrf2—key regulator of antioxidant defense—as well as of antioxidant enzymes NQO-1 and HO-1 and the redox-sensitive deacetylase SIRT1. Resveratrol also normalized TBARS levels and restored the GSH/GSSG ratio. Additionally, it prevented oxaliplatin-induced upregulation of GFAP, IBA-1, NFκB, TNFα, ATF3, and c-fos, maintaining expression levels comparable to those of control animals. Notably, oral resveratrol administration did not interfere with the antitumor efficacy of oxaliplatin, as tumor control was maintained in mice inoculated with CT26 colorectal cancer cells.

Finally, in the clinical study (**Project IV**), we analyzed a cohort of colorectal cancer patients treated with oxaliplatin and found symptoms compatible with CIPN in 73% of participants. Prevalence was higher in women (88%) than in men (60%), with a significant association between female sex and neurotoxicity development. No significant associations were observed with other variables such as age, overweight, cancer stage, chemotherapy regimen, or cumulative dose. In the overall cohort, only overweight showed sex-associated differences, being more prevalent in men. Among patients with CIPN, men were more likely to be

overweight and received higher cumulative doses. Interestingly, symptom severity appeared greater in males, as a higher proportion required oxaliplatin dose reduction.

Taken together, the results of this doctoral thesis contribute significantly to the understanding of the **cellular and molecular mechanisms** involved in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, as well as to the characterization of pain-related behaviors. Oxidative stress and glial activation in the dorsal root ganglia and spinal cord were identified as central processes in the drug-induced neurotoxicity and the development of pain. Moreover, **significant sex-related differences** were observed in symptom manifestation, both in preclinical models and in patients, as well as in the activation of glial and inflammatory cells and mediators, and in the modulation of key systems such as TRP channels and the endocannabinoid system. These findings reinforce the importance of systematically incorporating sex as a biological variable in the design and analysis of preclinical and clinical studies on chemotherapy-induced neuropathy. Additionally, it was demonstrated that preventive administration of **resveratrol exerts relevant neuroprotective effects** through activation of the endogenous antioxidant system, attenuation of oxidative damage, and modulation of neuroimmune processes. This intervention effectively reduced oxaliplatin-induced pain-related behaviors without interfering with its antitumor efficacy. Altogether, these findings open new perspectives for the development of effective, safe and personalized preventive and therapeutic strategies for chemotherapy-induced neuropathy.

Publicaciones

Parte de los resultados obtenidos en el marco de esta tesis doctoral han sido incluidos en los siguientes artículos científicos:

1. Anti-allodynic and anti-inflammatory effects of 17 α -hydroxyprogesterone caproate in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **Miguel, C. A.**, Raggio, M. C., Villar, M. J., González, S. L., & Coronel, M. F. *Journal of the peripheral nervous system* 2019, 24(1), 100–110. <https://doi.org/10.1111/jns.12307>
2. Resveratrol exerts anti-oxidant and anti-inflammatory actions and prevents oxaliplatin-induced mechanical and thermal allodynia. Recalde, M. D*, **Miguel, C. A***, Noya-Riobó, M. V., González, S. L., Villar, M. J., & Coronel, M. F. (* co-primeros autores). *Brain research* 2020, 1748, 147079. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147079>
3. Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions of resveratrol after experimental nervous system insults. Special focus on the molecular mechanisms involved. **Miguel, C. A.**, Noya-Riobó, M. V., Mazzone, G. L., Villar, M. J., & Coronel, M. F. *Neurochemistry international* 2021, 150, 105188. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105188>
4. Sex-related differences in oxaliplatin-induced changes in the expression of transient receptor potential channels and their contribution to cold hypersensitivity. **Miguel, C. A.**, Noya-Riobó, M. V., Brumovsky, P. R., Villar, M. J., & Coronel, M. F. *Neuroscience letters* 2022, 788, 136863. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136863>
5. Changes in the expression of endocannabinoid system components in an experimental model of chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain: Evaluation of sex-related differences. Noya-Riobó, M. V.*, **Miguel, C. A.***, Soriano, D. B., Brumovsky, P. R., Villar, M. J., & Coronel, M. F. (* co-primeros autores). *Experimental neurology* 2023, 359, 114232. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114232>
6. Prevalencia de la neuropatía inducida por oxaliplatino: diferencias asociadas al sexo. **Miguel, C.A.**, Cavasotto, L.C., López Sartorio, C., Marcolini, N., Gayet, F., & Coronel, M.F. *Medicina Buenos Aires*, 2025;85(3):501–510. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40577136/>

Agradecimientos

A la Universidad Austral y al Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT) por brindarme el espacio, los recursos y el entorno académico necesarios para formarme como becaria doctoral. El compromiso con la investigación, la excelencia y la formación humana que se respira en este ámbito fueron fundamentales para transitar este camino.

Al CONICET, por el financiamiento otorgado a través de la beca que hizo posible llevar adelante este proyecto.

A la Dra. María Florencia Coronel, por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su laboratorio, y guiarme con generosidad y compromiso desde mi carrera de grado. Agradezco profundamente su capacidad de alentarme en los momentos de mayor dificultad así como el entusiasmo por la ciencia que supo contagiarme a lo largo de todo este trayecto.

Al Dr. Marcelo Villar, por su valioso rol como co-director. Su mirada crítica desde su vasta experiencia para acompañar este proceso enriqueció significativamente el desarrollo del trabajo. Agradezco sus comentarios y el tiempo dedicado a guiarme en este recorrido.

A todos los miembros del laboratorio de dolor asociado al cáncer, en especial a la Dra. Graciela Mazzone, por sus aportes a mi formación.

Al equipo del bioterio, por su dedicación en el cuidado de los animales y la asistencia brindada durante los experimentos, cuya labor fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

A Tobi, por estar siempre dispuesto a colaborar y dar una mano en todo lo que fuera necesario.

A la Dra. Mariana Malvicini y a Marie, por su colaboración en la etapa final del proyecto.

A la Sra. Norma Montalbetti y a la Lic. Paula Roselló, quienes han sido colaboradoras fundamentales durante todo este camino, y a todos los miembros del instituto que ayudaron, de una u otra manera, en este proceso.

Al becaterio, que me acompañaron y ayudaron en distintos momentos, y que hicieron que este recorrido fuera más ameno y enriquecedor.

Una mención especial a Nico, quien estuvo a mi lado durante todo este proceso, brindándome su apoyo incondicional y alentándome en todo momento.

Y finalmente, a mi familia, que, si bien no siempre comprendieron en detalle lo que hacía, me acompañaron con amor, paciencia y confianza desde el primer día.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AEA: Anandamida
ANOVA: Análisis de varianza
ARN: Ácido ribonucleico
ASICs: Canales iónicos sensibles a ácido
ASCO: American Society of Clinical Oncology
ATF3: Factor de transcripción activador 3
ATP: Adenosín trifosfato
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA: Albúmina de suero bovino
CB1: Receptor cannabinoide tipo 1
CB2: Receptor cannabinoide tipo 2
CCR: Carcinoma colorrectal
CGRP: Péptido relacionado al gen de la calcitonina
CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CIE: Comité Institucional de Evaluación
CTL: Control
DABCO: 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol
DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA: Ácido etilenglicol-bis(2-aminoéter)tetraacético
ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FOLFOX: Régimen quimioterápico que incluye ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GSH: Glutati6n reducido
GSSG: Glutati6n oxidado
H: hora/s
HO-1: Hemo-oxigenasa 1
IBA-1: Proteína adaptadora de uni6n al calcio 1
IASP: Asociaci6n Internacional para el Estudio del Dolor
IC: Intervalo de Confianza
IIMT: Instituto de Investigaci6n en Medicina Traslacional
IL-1 β : Interleuquina 1 beta
IL-6: Interleuquina 6
IL-10: Interleuquina 10
IMC: Índice de masa corporal
INC: Instituto Nacional del Cancer
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
MBS: N-Maleimido-4-metilestireno
MDA: Malondialdehído
MIN: Minuto/s
MLVRT: Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MSHE: Medio de Eagle suplementado con suero y HEPES
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFκB: Factor nuclear kappa B
NGF: Factor de crecimiento nervioso
NPIO: Neuropatía periférica inducida por oxaliplatino
NPIQ: Neuropatía periférica inducida por quimioterapia
NMDA: Receptor de N-metil-D-aspartato
NO: Óxido Nítrico
NQO-1: NADPH-quinona oxidoreductasa 1
OCT: Gel para criostato de congelación
OMS: Organización Mundial de la Salud
OR: Odds ratio
OXA: Oxaliplatino
PBS: Solución salina tamponada con fosfato
PFA: Paraformaldehído
PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
QT: Quimioterapia
RAGE: Receptor para productos finales de glicación avanzada
RESV: Resveratrol
RESVp: Resveratrol administrado en esquema preventivo
RESVt: Resveratrol administrado en esquema terapéutico
RIPA: Tampón de lisis de proteínas
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT: Transcriptasa reversa
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real post transcripción reversa
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SEC: Sistema endocannabinoide
SEM: Error estándar de la media
SFB: Suero fetal bovino
SF: Solución fisiológica
SN: Sistema nervioso
SNP: Sistema nervioso periférico
SNC: Sistema nervioso central
SYBR: Sonda fluorescente para ADN
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA: Ácido tricloroacético
TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta
TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa
TRP: Receptores de potencial transitorio
XELOX: Régimen de quimioterapia que incluye capecitabina y oxaliplatino

Índice

Resumen	3
Abstract	7
Publicaciones	11
Agradecimientos	13
Abreviaturas	15
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 Neuropatía inducida por quimioterapia	23
1.1.1 Características particulares de la neuropatía inducida por oxaliplatino	25
1.1.2 Factores asociados al riesgo de desarrollar neuropatía por oxaliplatino.....	26
1.2 Nocicepción y dolor neuropático.....	28
1.2.1 De la nocicepción al dolor.....	29
1.2.2 Dolor neuropático: mecanismos involucrados	32
1.2.3 Evaluación de dolor en pacientes y en modelos animales	38
1.3 Mecanismos de acción antitumoral y efectos neurotóxicos del oxaliplatino.....	40
1.3.1 Acción antitumoral.....	40
1.3.2 Efectos neurotóxicos.....	42
1.4 Diferencias asociadas al sexo	44
1.4.1 En la prevalencia y severidad de cuadros de dolor persistente	44
1.4.2 En los mecanismos que subyacen al dolor persistente	45
1.4.3 En la prevalencia y severidad de la neuropatía inducida por quimioterapia	47
1.4.4 En los mecanismos que subyacen a la neurotoxicidad de los quimioterápicos	47
1.5 Efectos neuroprotectores del resveratrol	48
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
2.1 Hipótesis	53
2.2 Objetivo general	53
2.3 Objetivos específicos	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
Estudios preclínicos (Proyectos I, II y III).....	57

3.1 Evaluación por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio	57
3.2 Animales de experimentación	57
3.2.1 Ratas.....	57
3.2.2 Ratones	58
3.2.3 Grupos experimentales.....	58
3.3 Fármacos	58
3.4 Células tumorales	59
3.5 Esquemas de administración de fármacos y células tumorales.....	60
3.6 Evaluación del volumen tumoral en ratones	62
3.7 Estudios conductuales en ratas	63
3.7.1 Medición del peso y del consumo de alimento	63
3.7.2 Evaluación de indicadores de dolor espontáneo.....	64
3.7.3 Evaluación de alodinia mecánica: prueba de von Frey	64
3.7.4 Evaluación de alodinia térmica fría: prueba de Choi	65
3.7.5 Medición de parámetros de locomoción: prueba de campo abierto	66
3.8 Eutanasia y toma de muestras	67
3.9 Estudios bioquímicos, moleculares y de inmunomarcación	68
3.9.1 Determinación de glutatión utilizando un método espectrofotométrico.....	68
3.9.2 Estudio de marcadores de peroxidación lipídica por espectrofotometría.....	69
3.9.3 Evaluación de niveles de expresión génica mediante RT-qPCR	70
3.9.4 Determinación de los niveles del factor neurotrófico NGF mediante ELISA	72
3.9.5 Determinación de los niveles de endocannabinoides mediante ELISA.....	74
3.9.6 Ensayos de inmunomarcación	74
3.10 Análisis estadístico.....	76
Estudios clínicos (Proyecto IV)	76
3.11 Evaluación por el Comité de Ética.....	76
3.12 Diseño experimental y cohorte en estudio	77
3.13 Variables en estudio	77
3.14 Análisis estadístico.....	78
4. RESULTADOS	79
Proyecto I.....	81

4.1 Procesos neurotóxicos inducidos por oxaliplatino en estructuras clave de la neurotransmisión nociceptiva.....	81
4.1.1 Estrés y daño oxidativo	81
4.1.2 Daño y activación neuronal.	83
4.1.3 Activación glial y producción de mediadores proinflamatorios	86
4.2 Cambios conductuales inducidos por oxaliplatino	95
4.2.1 Desarrollo de alodinia mecánica y térmica fría	95
4.2.2 Ausencia de indicadores de dolor espontáneo	96
4.2.3 Cambios en el peso corporal y el consumo de alimento	97
4.2.4 Alteraciones en parámetros relacionados a locomoción	98
Proyecto II.....	99
4.3 Alteraciones conductuales inducidas por oxaliplatino en ratas hembra: similitudes y diferencias con las observadas en machos	99
4.3.1 Alteraciones en parámetros relacionados a locomoción	99
4.3.2 Ausencia de indicadores de dolor espontáneo	101
4.3.3 Cambios en el peso y el consumo de alimento	102
4.3.4 Desarrollo de alodinia mecánica y térmica fría	104
4.4 Cambios en la expresión de mediadores clave en la generación de dolor: diferencias asociadas al sexo	107
4.4.1 Receptores de potencial transitorio	107
4.4.2 Receptores cannabinoides y sus ligandos endógenos, los endocannabinoides	109
4.4.3 Marcadores de daño neuronal y activación glial	113
Proyecto III.....	118
4.5 Efectos de la administración terapéutica de resveratrol sobre las alteraciones comportamentales desencadenadas por oxaliplatino.....	118
4.6 Efectos de la administración preventiva de resveratrol sobre los cambios conductuales desencadenados por oxaliplatino	119
4.6.1 Prevención de alodinia mecánica y térmica fría	119
4.6.2 Ausencia de efectos sobre indicadores de dolor espontáneo.....	120
4.6.3 Atenuación de los cambios de peso y consumo de alimento	121
4.6.4 Efectos sobre parámetros de locomoción	122
4.7 Efectos de la administración preventiva de resveratrol sobre los procesos de daño inducidos por oxaliplatino	123
4.7.1 Disminución de marcadores de estrés y daño oxidativo	123
4.7.2 Activación del sistema de defensa antioxidante	124
4.7.3 Disminución de marcadores de neuroinflamación y daño neuronal	127
4.8 Impacto del resveratrol sobre la eficacia antitumoral del oxaliplatino	132
Proyecto IV.....	133

4.9 Estudio observacional en pacientes oncológicos tratados con oxaliplatino.....	133
4.9.1 Características demográficas y clínicas de la cohorte en estudio	133
4.9.2 Prevalencia de neuropatía inducida por oxaliplatino	135
4.9.3 Asociación entre el desarrollo de neuropatía y variables demográficas, clínicas y asociadas al tratamiento.....	136
4.9.4 Diferencias asociadas al sexo en la cohorte completa	137
4.9.5 Diferencias asociadas al sexo en el subgrupo de pacientes que desarrolló neurotoxicidad.....	139
4.9.6 Prevalencia de neuropatía inducida por oxaliplatino en el subgrupo de pacientes tratados con XELOX.....	140
5. DISCUSIÓN	141
5.1 Consideraciones generales	143
5.2 Procesos neurotóxicos y alteraciones comportamentales inducidas por oxaliplatino	144
5.3 Diferencias asociadas al sexo	151
5.4 Potencial neuroprotector del resveratrol	158
5.5 Prevalencia y características clínicas de la neuropatía por oxaliplatino	162
5.6 Contribuciones del trabajo y perspectivas futuras	164
6. BIBLIOGRAFÍA.....	167

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Neuropatía inducida por quimioterapia

La **neuropatía periférica inducida por quimioterapia** (NPIQ) es un efecto adverso frecuente y severo del tratamiento antitumoral. Es la complicación neurológica más prevalente, superada únicamente por las complicaciones hematológicas (Staff et al., 2017).

Esta neuropatía iatrogénica surge como resultado de las acciones neurotóxicas de numerosos **fármacos quimioterápicos** utilizados en el tratamiento de neoplasias, tanto sólidas como hematológicas. Entre las principales familias de quimioterápicos con toxicidad sobre el sistema nervioso periférico (SNP) se incluyen los derivados del platino (cisplatino, oxaliplatino), los taxanos (paclitaxel, docetaxel), los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), los inhibidores del proteasoma (bortezomib), algunos antimetabolitos (como citarabina) e inmunomoduladores (talidomida) (Bakogeorgos and Georgoulis, 2017; Staff et al., 2017). Incluso algunos de los más recientemente introducidos compuestos biológicos, como anticuerpos monoclonales (Velasco et al., 2021) o inhibidores de tirosina quinasa (Kavanagh et al., 2018; Roy et al., 2019), pueden inducir neurotoxicidad periférica.

El **impacto** de esta complicación derivada del tratamiento del cáncer **en la salud global** es altamente significativo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se registran aproximadamente 20 millones de nuevos casos de cáncer a nivel global. En Argentina, el Instituto Nacional del Cáncer (INC) informa una incidencia media-alta, con alrededor de 125.000 nuevos casos anuales. La mayoría de los pacientes con cáncer recibe quimioterapia, ya sea como tratamiento de primera línea o como terapia adyuvante o neoadyuvante, exponiéndolos al riesgo de desarrollar esta neuropatía tóxica (Bakogeorgos and Georgoulis, 2017; Colvin, 2019). De hecho, se estima que alrededor del 30-40% de los pacientes que reciban quimioterapia desarrollarán neurotoxicidad periférica, con porcentajes que ascienden hasta el 70-80% en el caso de fármacos con alto perfil neurotóxico como oxaliplatino o paclitaxel (Bakogeorgos and Georgoulis, 2017; Colvin, 2019).

Gracias a los avances recientes en el diagnóstico y el tratamiento, el porcentaje de pacientes que sobrevive al cáncer ha aumentado considerablemente. Este logro, desde ya muy alentador, pone sin embargo de manifiesto la creciente importancia de abordar los **efectos adversos a largo plazo de los tratamientos antineoplásicos** (Bakogeorgos and Georgoulis, 2017).

En cuanto a la fisiopatología y a la **presentación clínica**, la NPIQ es una axono-neuropatía de distribución bilateral, distal y simétrica, que se acompaña con síntomas motores, autonómicos y, principalmente, sensitivos (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017; Staff et al., 2019). Los síntomas motores incluyen debilidad, calambres y dificultades para caminar, subir un escalón, o realizar tareas sencillas como abrir un frasco o abrochar un botón, debido a fallas en la coordinación sensitivo-motora. Dentro de los síntomas autonómicos puede presentarse hipotensión ortostática, estreñimiento, o incontinencia. Dentro del espectro sensitivo, puede haber síntomas negativos, como la pérdida de sensibilidad frente a estímulos inocuos, o síntomas positivos, como el desarrollo de parestesias, disestesias y dolor de tipo neuropático (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017; Staff et al., 2019).

Las **parestesias**, generalmente el síntoma más frecuente, son sensaciones anormales como entumecimientos, hormigueos, pinchazos (Finnerup et al., 2021), que pueden manifestarse en forma espontánea o ser inducidas por estímulos específicos. Las **disestesias** son estas mismas sensaciones anormales percibidas como desagradables o incluso dolorosas (Finnerup et al., 2021). Finalmente, el **dolor neuropático**, el síntoma más severo y al que dedicaremos un apartado específico (ver sección 1.2), se caracteriza por ser persistente y puede manifestarse en forma espontánea o inducida (Finnerup et al., 2021). El dolor espontáneo ocurre en ausencia de estímulos nocivos y suele describirse como quemante, lacerante o similar a una descarga eléctrica (Finnerup et al., 2021). El dolor inducido incluye la alodinia, que es la percepción dolorosa de estímulos inocuos, y la hiperalgesia, que es dolor exagerado frente a estímulos nocivos (Finnerup et al., 2021; Jensen & Finnerup, 2014).

Se ha propuesto que la **severidad del cuadro clínico** depende de diversas variables como la dosis del fármaco quimioterápico administrada en cada ciclo, la dosis acumulada, la combinación con otros agentes neurotóxicos y la existencia de neuropatías previas, entre otros factores (Calls et al., 2020; Miltenburg & Boogerd, 2014; Staff et al., 2019). Sin embargo, no hay aún consenso en relación al impacto de cada una de estas variables, así como el de otros factores posiblemente involucrados. En la sección 1.1.2 se hará referencia con mayor detalle a los factores que probablemente influyan en el riesgo de desarrollar neurotoxicidad frente a la quimioterapia.

Actualmente, el **diagnóstico de la NPIQ** es esencialmente clínico y se basa en la evaluación que realiza el oncólogo, utilizando escalas validadas que evalúan la presencia y la severidad de los síntomas (McCrary et al., 2019). Raramente se realizan estudios como la velocidad de conducción nerviosa, biopsias de piel o biopsias de nervio para evaluar parámetros específicos relacionados con el daño nervioso (Colvin, 2019; Miltenburg & Boogerd, 2014).

Dependiendo de la severidad de los síntomas, la NPIQ puede obligar a reducir la dosis o incluso suspender el agente antineoplásico, condicionando la eficacia del tratamiento antitumoral y el pronóstico del paciente (Bakogeorgos and Georgoulas, 2017; Loprinzi et al., 2020). De este modo, esta neuropatía iatrogénica se convierte en un factor limitante para la administración de dosis óptimas en los tratamientos antitumorales. Lamentablemente, esta **reducción o suspensión del fármaco** es, hasta ahora, la única estrategia disponible para controlar la neuropatía y sus síntomas asociados (Bakogeorgos and Georgoulas, 2017). A pesar de ello, en muchos casos el daño es irreversible y los síntomas persisten a largo plazo.

A diferencia de otras condiciones derivadas del daño del sistema nervioso (SN), en el contexto del tratamiento quimioterápico se conoce con precisión el momento en el que el paciente será expuesto a la noxa (es decir, el agente neurotóxico), definiendo una ventana temporal en la que podrían aplicarse **estrategias preventivas**. De este modo, de contar con medidas efectivas, estas se podrían implementar de manera sistemática, antes o durante el tratamiento quimioterápico, convirtiendo a la NPIQ en una neuropatía potencialmente prevenible. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados en los últimos años, no se han identificado aún estrategias con valor preventivo demostrado, como se reporta en la última revisión de las Guías para la prevención y el tratamiento de la NPIQ, elaboradas por referentes de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, por sus siglas en inglés) (Loprinzi et al., 2020).

Lamentablemente, tampoco se dispone de **tratamientos modificadores de enfermedad**, capaces de retrasar o revertir el daño de los nervios periféricos (Bakogeorgos and Georgoulas, 2017; Loprinzi, 2020; Yamamoto and Egashira, 2021). En cuanto a los **tratamientos sintomáticos**, la disponibilidad de fármacos con eficacia analgésica es limitada, y éstos sólo ofrecen alivio del dolor a algunos pacientes (Majithia et al., 2016). En líneas generales, se utilizan los mismos fármacos que se emplean para el tratamiento del dolor neuropático de diferente etiología, incluyendo opioides como tramadol y tapentadol, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina como duloxetina y venlafaxina, y anticonvulsivantes como pregabalina y gabapentina (Jesus Palma et al., 2025; Majithia et al., 2015; Mattar et al., 2024; Staff et al., 2019). A pesar de que únicamente la duloxetina cuenta con evidencia favorable según la mencionada Guía de la ASCO (Loprinzi et al., 2020; Smith et al., 2013), en la práctica clínica, tanto los opioides como los gabapentinoides se utilizan con relativa eficacia (Jesus Palma et al., 2025).

1.1.1 Características particulares de la neuropatía inducida por oxaliplatino

El **oxaliplatino**, un derivado del platino de tercera generación es uno de los agentes quimioterápicos que más frecuentemente desencadena neuropatía y dolor. A nivel mundial, se ha reportado que entre el **60%** y el **80%** de los pacientes que reciben regímenes basados en oxaliplatino desarrollan neurotoxicidad periférica con gran variabilidad entre regiones (Staff et al., 2019). Se desconoce la prevalencia de la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO) en nuestro País.

Sin embargo, sí se sabe que el **carcinoma colorrectal** (CCR) es el segundo tumor más frecuente en Argentina con alrededor de 15.000 nuevos casos por año (www.inc.gov.ar), y que el oxaliplatino es el principal agente quimioterápico utilizado en su tratamiento (Staff et al., 2019). Los regímenes basados en oxaliplatino se utilizan también para tratar tumores de páncreas, gástricos y esofágicos, entre otros. Gracias a su eficacia en el control tumoral, este derivado del platino ha mejorado significativamente las tasas de supervivencia. Sin embargo, al inducir neurotoxicidad periférica con síntomas que, en muchos casos, persisten a largo plazo, afecta negativamente la calidad de vida de los sobrevivientes (Calls et al., 2020; Staff et al., 2019).

La **neuropatía inducida por oxaliplatino** puede manifestarse de forma aguda o crónica (Calls et al., 2020; Miltenburg & Boogerd, 2014). La **neuropatía aguda** se manifiesta durante la administración del fármaco y en los días posteriores, y se caracteriza por la presencia de hipersensibilidad al frío, disestesias faríngeas, disfagia inducida por bebidas frías y calambres musculares (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2019). Estos síntomas suelen iniciar durante la infusión del quimioterápico, alcanzando su máxima intensidad entre las 24 y 72 horas posteriores, y remitiendo en los días posteriores. Sin embargo, en algunos casos, no se logra la recuperación completa entre ciclos (Loprinzi et al., 2020). El cuadro reaparece o se hace más severo cuando el paciente recibe un nuevo ciclo de quimioterapia, tendiendo a empeorar con los ciclos sucesivos (Loprinzi et al., 2020).

Una vez finalizado el tratamiento quimioterápico, los síntomas pueden resolver espontáneamente entre 6 y 12 meses después. Sin embargo, en un elevado porcentaje de

pacientes se observa un patrón de empeoramiento progresivo, fenómeno conocido como "coasting", que puede derivar en una **neuropatía crónica** (Loprinzi et al., 2020). Finalmente, algunos pacientes debutan con el cuadro clínico varios meses después de completada la quimioterapia (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017). Como se puede apreciar, la evolución es sumamente variable y se desconocen los factores que influyen en la misma.

Siguiendo el patrón característico de la NPIQ, los pacientes que desarrollan neuropatía por oxaliplatino presentan síntomas motores, autonómicos y, en mayor medida, sensitivos. Entre los **síntomas** más frecuentemente reportados se encuentran los entumecimientos, los hormigueos, los calambres musculares y el dolor (Calls et al., 2020; Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017). Los entumecimientos y hormigueos suelen preceder al dolor y tienden a ser preponderantes. La distribución de estos síntomas sigue un patrón en "guante y calcetín", iniciándose distalmente en los dedos de las manos y los pies, con progresión proximal conforme la condición empeora (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2019).

Además, en el caso de la NPIO, la hipersensibilidad al frío es una de las características distintivas, manifestándose como disestesias y dolor urente en respuesta a estímulos fríos, y calambres musculares inducidos por bajas temperaturas (Saif & Reardon, 2005). Estos síntomas pueden volverse progresivamente incapacitantes, afectando la **calidad de vida** y limitando actividades diarias como la manipulación de objetos fríos, el consumo de alimentos o líquidos fríos o la exposición a ambientes con temperaturas bajas. Los síntomas neuropáticos generan tal malestar en los pacientes que a menudo obligan a reducir la dosis del fármaco o incluso a interrumpir el tratamiento (Staff et al., 2019).

1.1.2 Factores asociados al riesgo de desarrollar neuropatía por oxaliplatino

Como se mencionó brevemente en la sección anterior, se desconocen en gran medida las variables que influyen en el desarrollo y la severidad de la NPIQ. En diversos estudios se ha propuesto que **variables asociadas al tratamiento**, tales como la dosis de quimioterápico administrada por ciclo, la dosis acumulada y el uso combinado con otros agentes neurotóxicos podrían tener un rol fundamental (Calls et al., 2020; Staff et al., 2019). Sin embargo, no existe consenso respecto a otros factores potencialmente implicados.

En los últimos años, se ha intentado identificar **factores asociados a riesgo** con el objeto de estratificar los pacientes, adaptar los esquemas quimioterápicos y aplicar estrategias preventivas, cuando estuvieran disponibles (Staff et al., 2019). Siguiendo este lineamiento, la observación de que elevadas dosis acumuladas de oxaliplatino incrementan significativamente el riesgo de neuropatía y dolor, seguida por la constatación de que tratamientos más breves y con menores dosis acumuladas conservan la eficacia en el control tumoral, llevaron recientemente a reducir el número de dosis de los esquemas basados en oxaliplatino, en ciertos grupos de pacientes con CCR (Grothey et al., 2018).

Este cambio en la práctica clínica se implementó tras la publicación del estudio IDEA en 2018 (Grothey et al., 2018), cuando se demostró que, en pacientes con CCR con bajo riesgo de recaída un tratamiento adyuvante de 3 meses con XELOX (régimen que incluye capecitabina y oxaliplatino) era tan efectivo como uno de 6 meses en términos de supervivencia libre de

recaída y mortalidad, además de estar asociado con una menor incidencia de neuropatía (Grothey et al., 2018). Estos datos subrayan que **la elección del régimen de tratamiento puede ajustarse**, dentro de ciertos márgenes, considerando las características del paciente y el riesgo de neurotoxicidad.

Además de las propiedades farmacológicas y el perfil de toxicidad específico de cada agente quimioterápico, se han propuesto otros **factores que podrían influir en el riesgo de desarrollar neurotoxicidad periférica** (Bakogeorgos & Georgoulas, 2017a; Staff et al., 2019). Entre ellos, destacan las variables demográficas (edad, sexo), antropométricas (peso, índice de masa corporal (IMC)), comorbilidades (diabetes, neuropatías previas, cuadros de dolor persistente), factores relacionados al tumor (tipo, estadio) y aspectos específicos del tratamiento quimioterápico (esquema utilizado, dosis por ciclo, dosis acumulada, combinación con otros fármacos) (Bakogeorgos & Georgoulas, 2017a; Staff et al., 2019).

Por ejemplo, la **edad avanzada** se ha relacionado con una mayor incidencia de neuropatía, probablemente debido a una reducción de la capacidad de regeneración neuronal y cambios en el metabolismo del fármaco en pacientes añosos (Abdel-Rahman, 2019). El **sexo** también ha sido propuesto como un posible factor de riesgo para la neurotoxicidad por oxaliplatino ya que factores hormonales, metabólicos y farmacocinéticos podrían influir en una vulnerabilidad diferencial (Mizrahi et al., 2021a; Zribi et al., 2020). El **peso** y el **IMC** también han sido evaluados, encontrándose que un IMC elevado podría influir en la distribución del oxaliplatino y, por ende, en su toxicidad periférica (Abdel-Rahman, 2019). En cuanto a las **comorbilidades**, la diabetes y las neuropatías preexistentes han mostrado ser factores predisponentes bien documentados, ya que el daño previo (aún subclínico) de los nervios periféricos puede potenciar las alteraciones inducidas por los quimioterápicos neurotóxicos (Uwah et al., 2012). Por otro lado, los **factores relacionados al tumor**, como el estadio avanzado, podrían estar asociados con esquemas de tratamiento más agresivos, aumentando así el riesgo de neurotoxicidad. Además, **factores relacionados al tratamiento** como las dosis de oxaliplatino administradas por ciclo, el tiempo entre dosis y la combinación con otros fármacos según el esquema utilizado podrían influir en el perfil de toxicidad (Cassidy et al., 2011). Sin embargo, los hallazgos reportados hasta la fecha son escasos, muchas veces contradictorios, y no han resultado concluyentes (Bakogeorgos & Georgoulas, 2017; Staff et al., 2019). Por lo tanto, **aún no se ha alcanzado consenso en cuanto a factores con valor predictivo demostrado**. Cabe señalar, además, que todos los estudios mencionados se han llevado a cabo en poblaciones de otras regiones y contextos, lo que resalta la necesidad de investigar estos factores en nuestra población local.

En síntesis, actualmente no se dispone de datos sobre la prevalencia ni sobre las características clínicas de la neuropatía inducida por quimioterapia en pacientes tratados con oxaliplatino en Argentina o en la región. Asimismo, se desconoce si variables como la edad, el sexo, el peso, el IMC, el estadio tumoral, el esquema quimioterápico o la dosis acumulada del fármaco se relacionan con una mayor prevalencia o severidad de los síntomas en esta población. Esta falta de información limita la identificación de factores de riesgo y el desarrollo de estrategias personalizadas para su prevención y tratamiento. Este trabajo de tesis propone abordar esta problemática a fin de caracterizar la prevalencia, severidad y evolución de la neuropatía inducida por oxaliplatino, así como explorar la posible asociación con variables clínicas y terapéuticas relevantes en una cohorte local de pacientes con CCR.

1.2 Nocicepción y dolor neuropático

Como se mencionó previamente, la NPIQ se manifiesta principalmente a través de alteraciones sensitivas que abarcan desde la pérdida de sensibilidad a estímulos inocuos hasta el desarrollo de parestesias, disestesias y dolor persistente, de tipo neuropático, siendo este último el síntoma más severo (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017; Staff et al., 2019).

El **dolor neuropático** es un tipo de dolor persistente y patológico, definido como aquel dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial (Jensen et al., 2011), ya sea a nivel del SNP o del sistema nervioso central (SNC) (Fig. 1). El dolor neuropático puede originarse por múltiples **causas**, incluyendo lesiones traumáticas del SN, accidentes cerebrovasculares hemorrágicos o isquémicos, enfermedades metabólicas como la diabetes, infecciones virales como el herpes zóster, enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, o neuropatías tóxicas por el consumo crónico de alcohol o exposición a metales pesados, entre otras (Finnerup et al., 2021; Scholz et al., 2019).

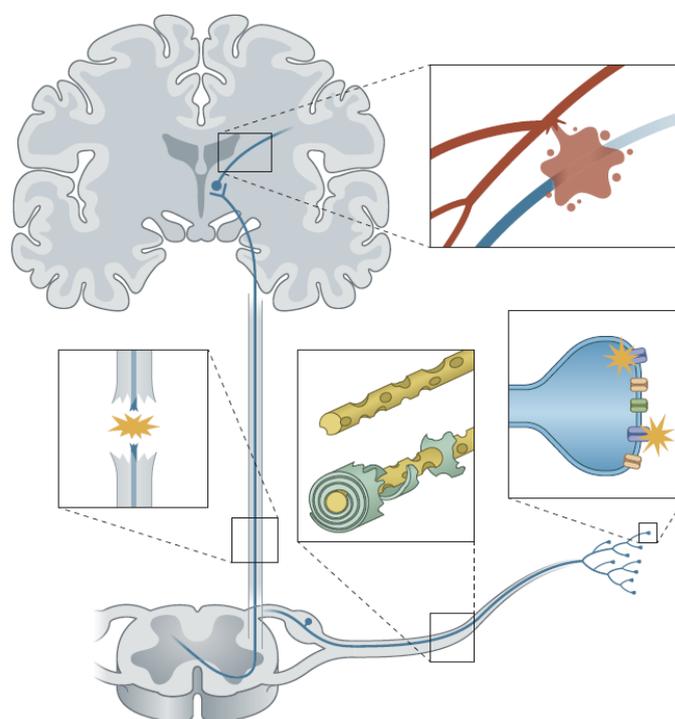


Figura 1. Diagrama que representa las diferentes estructuras que componen el sistema somatosensorial, desde los nervios periféricos, pasando por los ganglios raquídeos y la médula espinal, hasta las regiones cerebrales. Las lesiones y enfermedades que afectan dichas estructuras desencadenan alteraciones en la neurotransmisión nociceptiva generando dolor neuropático. Tomado de (Finnerup et al., 2021).

En la NPIQ el dolor neuropático se genera como consecuencia del daño neurotóxico que los agentes antineoplásicos ejercen en las neuronas aferentes primarias. Estas neuronas sensitivas, cuyos cuerpos celulares se localizan en los ganglios anexos a la raíz dorsal y cuyos axones constituyen los nervios periféricos, son el principal blanco de las acciones neurotóxicas de estos fármacos (Finnerup et al., 2021).

En las próximas secciones se presentarán los actores involucrados en el proceso fisiológico de la nocicepción (sección 1.2.1), los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (sección 1.2.2) y los procesos de neurotoxicidad inducidos por oxaliplatino, que pueden contribuir al desarrollo de dolor persistente (sección 1.3.2).

1.2.1 De la nocicepción al dolor

El **dolor nociceptivo** se define como “aquella experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial” (Raja et al., 2020). Se trata de un mecanismo fisiológico y adaptativo de protección. En respuesta a un daño tisular o un estímulo potencialmente lesivo, la activación del sistema nociceptivo desencadena esa experiencia desagradable que es el dolor a fin de minimizar el daño y promover la reparación del tejido lesionado (Latremoliere & Woolf, 2009).

Las **neuronas aferentes primarias** son el primer eslabón en las vías nociceptivas: detectan estímulos nocivos en los tejidos periféricos y transmiten esa información al sistema nervioso central. Estas neuronas pseudounipolares, a través de sus proyecciones periféricas, inervan piel, músculos, articulaciones y vísceras donde detectan tanto estímulos inocuos, de baja intensidad, como nocivos, de alta intensidad y capaces de inducir daño tisular y dolor (ver Fig. 2) (Basbaum et al., 2009; Scholz & Woolf, 2002). Las neuronas aferentes primarias constituyen una población heterogénea y pueden clasificarse según el tamaño del soma, el diámetro de los axones, y el tipo de información que transmiten (Middleton et al., 2021). Las neuronas de cuerpo celular grande dan origen a **fibras A α y A β** , que son gruesas, mielinizadas y de alta velocidad de conducción. Detectan y transmiten información propioceptiva (posición corporal, movimiento) y mecanoceptiva táctil (presión, vibración), respectivamente (McGlone & Reilly, 2010). Las neuronas medianas dan origen a **fibras A δ** que son delgadas, mielinizadas y de velocidad de conducción moderadamente rápida. Participan en la detección y conducción de información sobre estímulos térmicos del rango inocuo y estímulos nocivos de las tres modalidades -químicos, mecánicos y térmicos- (dolor rápido, bien localizado y de corta duración, dolor agudo) (Lithfous et al., 2022). Finalmente, las neuronas pequeñas dan origen a **fibras C**, delgadas, amielínicas, y de velocidad de conducción lenta. Detectan temperatura, tacto y estímulos nocivos de las tres modalidades (dolor lento, difuso y persistente, descrito como quemante, urente) (Perl, 2007).

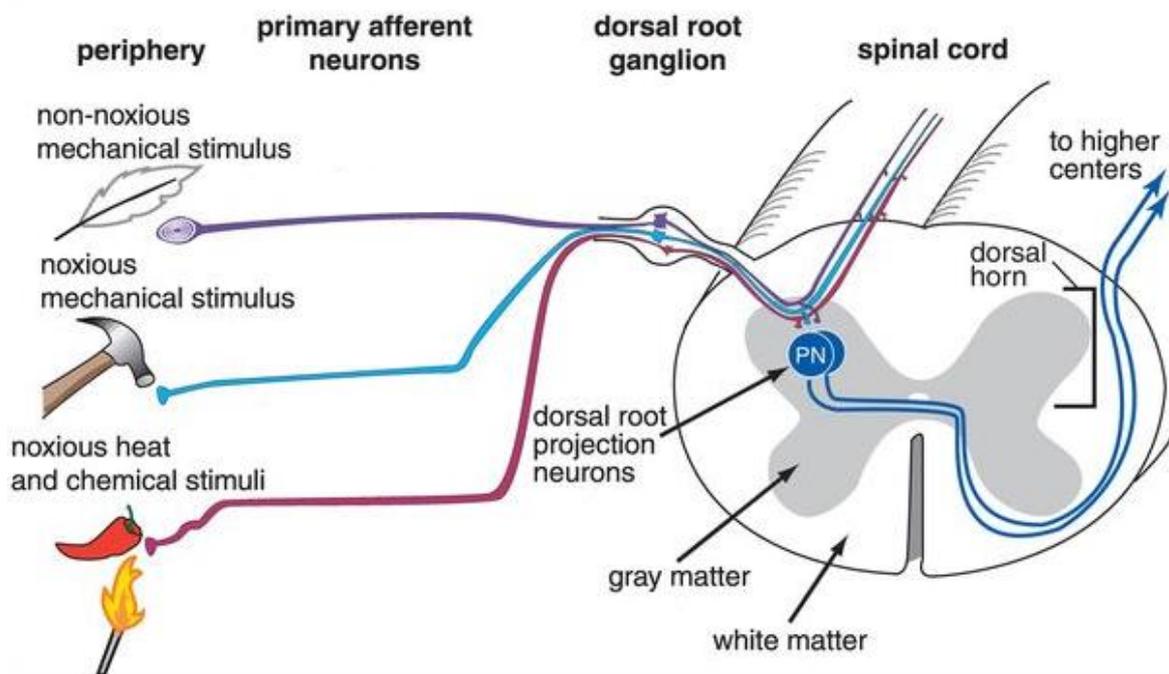


Figura 2. Esquema representativo que ilustra la detección de estímulos inocuos y nocivos por parte de las neuronas aferentes primarias. La información sobre los mismos es luego conducida hacia el asta dorsal de la médula espinal y centros superiores. Tomado de (Stahl, 2022).

Los estímulos químicos, mecánicos o térmicos son detectados por **receptores** localizados en las terminaciones periféricas de las neuronas aferentes primarias. Entre ellos, los receptores purinérgicos (P2X y P2Y) que responden al ATP liberado en contextos de daño tisular e inflamación, los receptores de bradicinina (B1 y B2) que median la sensibilización en condiciones inflamatorias, los canales iónicos ASICs (del inglés Acid-Sensing Ion Channels) que detectan acidosis tisular asociada a inflamación, isquemia o daño tisular, los receptores PIEZO que responden a estímulos mecánicos, y los receptores de potencial transitorio (TRPs) incluyendo TRPV1 que es activado por calor nocivo, TRPM8 por frío inocuo y TRPA1 por frío nocivo e irritantes químicos (Basbaum et al., 2009; Coste et al., 2010; Scholz & Woolf, 2002). La activación de estos receptores desencadena, ya sea en forma directa o a través de cascadas de señalización intracelular, la apertura de canales iónicos, generando potenciales de acción (Basbaum et al., 2009). En este proceso los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9) desempeñan un papel clave, regulando la excitabilidad neuronal y la transmisión de la información sobre estímulos nocivos y contribuyendo a la amplificación, persistencia y modulación del dolor (Abrahamsen et al., 2008; Dib-Hajj et al., 2008).

La información nociceptiva es conducida por las neuronas aferentes primarias hacia el **asta dorsal de la médula espinal** (Fig. 3), donde establecen sinapsis con interneuronas locales y neuronas de proyección (Basbaum et al., 2009). Según establece la organización de Rexed, el asta dorsal se puede segmentar en capas funcionales con diferentes roles en la transmisión y modulación de la información nociceptiva (Todd, 2010):

- La lámina I contiene neuronas de proyección, que reciben información principalmente de fibras A δ y C y la transmiten a centros superiores, como el tálamo y el tronco encefálico. Es crucial en la detección de estímulos nocivos y temperatura en el rango inocuo.

- La lámina II, también conocida como sustancia gelatinosa, está compuesta en su mayoría por interneuronas inhibitorias y excitatorias. Modula la transmisión del dolor a través de mecanismos inhibitorios mediados por GABA y encefalinas, regulando la entrada de señales nociceptivas a capas más profundas.
- Las láminas III y IV reciben aferencias principalmente de fibras A β , que transmiten información sobre estímulos mecánicos inocuos (como tacto y presión). Aunque no están directamente involucradas en la transmisión del dolor, pueden participar en la sensibilización central y la alodinia.
- La lámina V aloja a las denominadas neuronas de rango dinámico amplio que integran información de estímulos nocivos e inocuos al recibir aferencias de fibras C, A δ y A β . Estas neuronas proyectan al tálamo y otras regiones del encéfalo involucradas en la percepción del dolor y son clave en la sensibilización central (proceso que se describirá con más detalle en la siguiente sección), facilitando fenómenos como la hiperalgesia y la alodinia.
- La lámina VI recibe información de fibras A β y A δ y está implicada en la propiocepción y la respuesta a estímulos nociceptivos profundos (como el dolor muscular o articular). También participa en la modulación de reflejos motores en respuesta a estímulos nocivos.

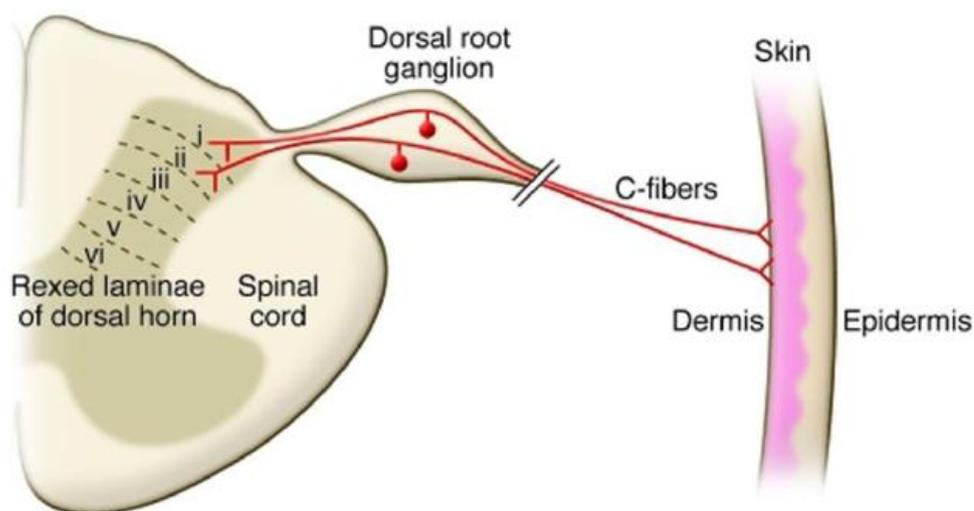


Figura 3: Organización laminar del asta dorsal de la médula espinal en la que se representan las aferencias de fibras C hacia las láminas I y II. Tomado de (Dubin & Patapoutian, 2010).

Esta organización en láminas permite la modulación e integración de diferentes modalidades sensoriales, desempeñando un papel crucial en la nocicepción (Todd, 2010). Las neuronas de proyección transmiten la señal sobre estímulos inocuos y nocivos a centros superiores a través de **vías ascendentes** (Basbaum et al., 2009). La vía espinotalámica es la principal responsable de la conducción de información nociceptiva hacia el tálamo y la corteza somatosensorial, permitiendo la percepción consciente del dolor (Basbaum et al., 2009). Las vías espinoparabraquial y espinoreticular transmiten señales hacia el tronco encefálico y el sistema límbico, participando en la modulación autonómica y afectiva del dolor.

Diversas **áreas cerebrales** participan en la generación, interpretación y modulación de la experiencia de dolor. La corteza somatosensorial primaria y secundaria (S1 y S2) se ocupan de la discriminación sensorial del dolor, procesando información sobre su localización, intensidad y duración. En paralelo, estructuras como la ínsula y la corteza anterior cingulada están implicadas en los aspectos afectivos y motivacionales del dolor, mientras que la amígdala y el hipotálamo median respuestas emocionales y autonómicas. Además, regiones del cortex prefrontal participan en la valoración cognitiva y la anticipación del dolor, integrando experiencias previas y contexto. Este conjunto de áreas forma lo que se conoce como la "matriz del dolor", una red funcional que explica la multidimensionalidad de esta experiencia (Apkarian et al., 2005; Garcia-Larrea & Peyron, 2013; Tracey & Mantyh, 2007).

1.2.2 Dolor neuropático: mecanismos involucrados

El **dolor neuropático** es un dolor patológico que surge como consecuencia de alteraciones en la transmisión y el procesamiento de las señales nociceptivas luego de una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial. Como ya se ha mencionado, el dolor neuropático es el síntoma más severo en los pacientes con neuropatía por quimioterapia, por lo que reviste particular importancia en el estudio de esta neuropatía tóxica.

Los **mecanismos** que contribuyen al desarrollo de dolor persistente en el contexto de la NPIQ no se encuentran aún dilucidados (Argyriou et al., 2006). Cabe mencionar que esta entidad ha adquirido relevancia clínica recién en los últimos años, como consecuencia del uso generalizado de agentes quimioterápicos y del aumento de la sobrevida de los pacientes oncológicos. A diferencia de ello, en las últimas décadas se ha avanzado de manera significativa en la identificación de los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático asociado a otras condiciones que afectan el SN. A continuación, se presentarán algunos de estos mecanismos, entre los que se destacan aquellos que inducen fenómenos de **sensibilización periférica y central**, considerados pilares en la fisiopatología del dolor neuropático (Finnerup et al., 2021). Se hará especial mención a aquellos mediadores cuyo rol será analizado en el contexto de la neuropatía inducida por quimioterápicos en esta tesis.

La **sensibilización periférica** es el proceso por el cual se produce un aumento en la excitabilidad de las fibras aferentes primarias lesionadas o expuestas a un entorno inflamatorio. Se atribuye, entre otros mecanismos, a la disminución en el umbral de activación, la presencia de descargas espontáneas y los cambios en el fenotipo (Finnerup et al., 2021; Scholz & Woolf, 2002), a los que se hará referencia a continuación.

A diferencia de lo que ocurre en condiciones fisiológicas, donde sólo los estímulos de alta intensidad —es decir, capaces de causar daño tisular— activan a los nociceptores y generan dolor (Fig. 4a), en condiciones patológicas incluso estímulos de baja intensidad pueden desencadenar una respuesta dolorosa (Fig. 4b). Luego de una lesión o daño de los tejidos o incluso los nervios periféricos pueden ocurrir cambios inflamatorios en el microambiente de la fibra nerviosa, con acumulación de factores liberados por células no neuronales residentes o infiltradas (incluyendo macrófagos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, plaquetas, células

endoteliales, queratinocitos y fibroblastos) o por los propios nociceptores (Scholz & Woolf, 2002). Estos factores incluyen neurotransmisores (glutamato), péptidos (sustancia P, péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP), bradisinina), eicosanoides y lípidos relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocannabinoides), neurotrofinas, citoquinas y quemoquinas, así como ATP y protones (ver Fig. 4a) (Boddeke, 2001; Mantyh et al., 2002). Como se mencionó previamente, los nociceptores expresan receptores capaces de reconocer y responder a estos agentes pro-inflamatorios. Estas interacciones aumentan la excitabilidad de los nociceptores, produciéndose una **disminución en el umbral de activación** (Fig. 4b), que permite la generación de potenciales de acción ante estímulos térmicos, mecánicos o químicos de baja intensidad (inocuos) y contribuye al desarrollo de alodinia (Gold & Gebhart, 2010).

Entre los mediadores mencionados se destacan las **neurotrofinas** como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y las **citoquinas proinflamatorias** como la interleuquina-1 β (IL-1 β), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), que modulan la excitabilidad neuronal y alteran la función de los nociceptores, contribuyendo a la sensibilización periférica (Binshtok et al., 2008; Üçeyler et al., 2009). La acción de **NGF** sobre su receptor TrkA ha sido ampliamente implicada en la sensibilización de las fibras C. Mediante la activación de vías de señalización intracelular, potencia la función de proteínas blanco en la terminal periférica, en particular TRPV1, generando un cambio rápido en la sensibilidad al calor (Chuang et al., 2001). Adicionalmente, el NGF es transportado retrógradamente al soma del nociceptor, donde promueve la expresión de proteínas pronociceptivas como la sustancia P, TRPV1 y la subunidad del canal de sodio Nav1.8 (Chao, 2003; Ji et al., 2002). Por su parte, las citoquinas **TNF α e IL-1 β** , a través de la interacción con sus receptores específicos expresados en neuronas aferentes primarias, potencian la actividad de canales iónicos y la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Üçeyler et al., 2009).

Además, las neuronas lesionadas desarrollan **actividad ectópica** (Fig. 4c), pudiendo generar potenciales de acción sin mediar un estímulo externo. La desregulación de los canales iónicos y la acumulación aberrante de canales de sodio, como Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, en sitios de lesión axonal o en los ganglios de la raíz dorsal conduce el desarrollo de descargas espontáneas contribuyendo a la alodinia y la hiperalgesia (Hameed, 2019).

Finalmente, tras una lesión del nervio pueden ocurrir **alteraciones en la expresión génica** (Fig. 4d), desencadenando cambios en el fenotipo y las propiedades funcionales de las neuronas aferentes primarias (Hayward et al., 2024). También se produce la sobreexpresión y disfunción de canales iónicos como **TRPs y PIEZO**, involucrados en la transducción de estímulos térmicos y mecánicos, contribuyendo a la aparición de alodinia e hiperalgesia, síntomas característicos del dolor neuropático. Por otra parte, las fibras mielinizadas A β , que normalmente transmiten estímulos táctiles inocuos, pueden comenzar a expresar receptores típicos de nociceptores, como TRPV1, lo que las vuelve capaces de generar respuestas dolorosas ante estímulos mecánicos de baja intensidad (alodinia mecánica) (Scholz & Woolf, 2002).

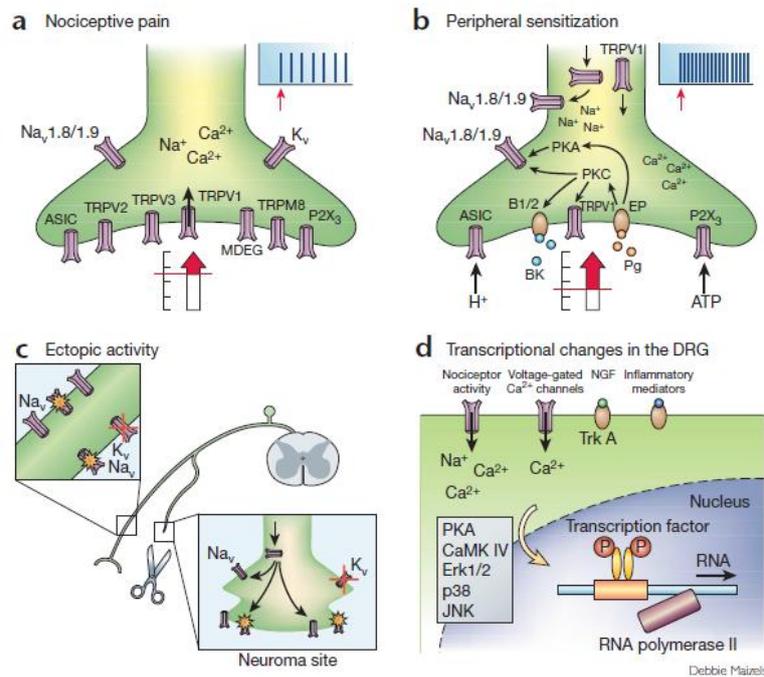


Figura 4. Esquemas que representan los mecanismos involucrados en la generación de dolor nociceptivo (a) y de dolor neuropático (b, c, d), incluyendo procesos de sensibilización periférica como la disminución en el umbral de activación de los nociceptores (b), la presencia de descargas espontáneas de las fibras lesionadas (c) y cambios en el fenotipo de las neuronas aferentes primarias (d). Imagen tomada de (Scholz & Woolf, 2002).

Además de los mecanismos periféricos, diversos procesos que conducen a la hiperexcitabilidad de los circuitos nociceptivos tienen lugar en la médula espinal y en las distintas áreas cerebrales involucradas. Se los denomina procesos de **sensibilización central** y contribuyen a la amplificación de la señal nociceptiva y al desarrollo de dolor neuropático (Burstein et al., 2000; Sarkar et al., 2000).

A nivel del asta dorsal, ocurre un **aumento en la excitabilidad de las neuronas de proyección** (Fig. 5a), mediado por la activación sostenida de los receptores de glutamato, en particular los receptores NMDA, potenciado por otros mediadores como la **sustancia P** y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Liu et al., 1997; Lu et al., 2007). Esta activación reduce el umbral de disparo de las neuronas del asta dorsal, prolongando y amplificando las respuestas a estímulos nocivos y generando fenómenos como la hiperalgesia. En particular, la secreción de **BDNF** desencadena alteraciones en los gradientes de cloro mediados por KCC2 en neuronas espinales, generando desinhibición espinal (Salter and Beggs, 2014). Además, la fosforilación de canales iónicos y los cambios en la expresión de proteínas sinápticas (Fig. 5b) facilitan una potenciación a largo plazo en estas vías (Scholz & Woolf, 2002).

También pueden producirse alteraciones en la conectividad debido a la **reorganización de los terminales aferentes** (Fig. 5c), facilitando la amplificación de las señales de dolor (Y. F. Zhu & Henry, 2012). Por ejemplo, fibras A β que normalmente hacen sinapsis con neuronas espinales no nociceptivas, pueden ganar acceso a neuronas nociceptivas, contribuyendo al desarrollo de alodinia (Y. F. Zhu & Henry, 2012).

En paralelo, la **pérdida del tono inhibitorio espinal** contribuye a la amplificación del dolor (Fig. 5d). En condiciones fisiológicas, interneuronas GABAérgicas y glicinérgicas modulan la transmisión nociceptiva mediante mecanismos inhibitorios pre y postsinápticos (Zeilhofer et al., 2012). Sin embargo, en estados de dolor neuropático, se observa pérdida de función de estas interneuronas y reducción en la expresión de los receptores GABA_A y glicina, disminuyendo la inhibición sináptica (Zeilhofer et al., 2012). Como resultado, las neuronas de proyección quedan desinhibidas, permitiendo que señales nociceptivas asciendan sin control hacia estructuras supramedulares (Scholz & Woolf, 2002). Esta desregulación también facilita la entrada de información sensorial no nociceptiva en circuitos del dolor, promoviendo la alodinia mecánica y térmica. De este modo, estímulos normalmente inocuos pueden percibirse como dolorosos debido a la activación aberrante de vías nociceptivas.

Otro sistema que interviene en la modulación endógena del dolor, generalmente con acciones inhibitorias, es el **sistema endocannabinoide (SEC)**, expresado a lo largo de la vía nociceptiva e integrado por ligandos lipídicos, sus enzimas de síntesis y degradación y los receptores cannabinoides (Finn et al., 2021; Maldonado et al., 2016). Se ha descrito que, en condiciones de lesión del SN, se producen cambios en la expresión de los componentes del SEC, que contribuyen al establecimiento de dolor persistente (Garcia-Ovejero et al., 2009).

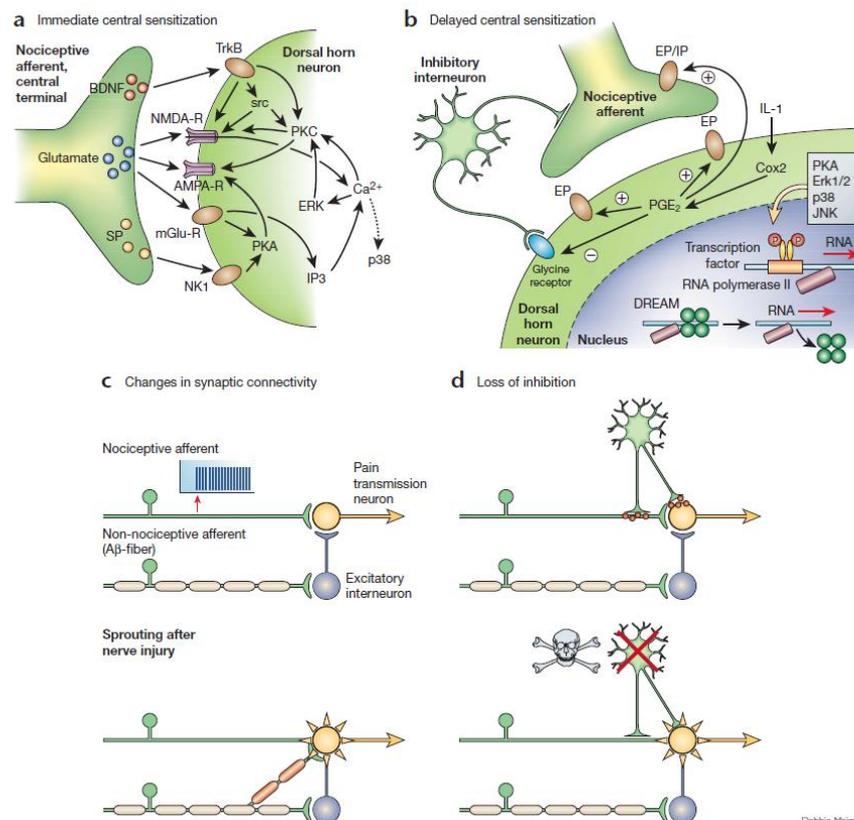


Figura 5. Esquemas que representan los mecanismos involucrados en el proceso de sensibilización central, incluyendo el aumento en la excitabilidad por la activación sostenida de los receptores glutamatérgicos (a), los cambios en la expresión y la modulación de la actividad de mediadores de la neurotransmisión nociceptiva (b), la reorganización de terminales aferentes (c) y la pérdida del tono inhibitorio espinal (d). Imagen tomada de (Scholz & Woolf, 2002).

Por otro lado, la **activación de células gliales** y la producción de mediadores pro-inflamatorios desempeñan un papel clave en la generación y el mantenimiento del dolor neuropático, contribuyendo a la sensibilización de los circuitos nociceptivos tanto a nivel periférico como a nivel central (Fig. 6) (Ji et al., 2016; Lim et al., 2017). Las células de Schwann del nervio, las células satelitales del ganglio y los astrocitos y la microglía de la médula espinal responden a las lesiones del SN liberando diversos mediadores que favorecen la excitabilidad neuronal (Hossain et al., 2017; Z. Wei et al., 2019).

El daño a las **células de Schwann** genera disrupción de la mielina, cambios en la conducción axonal, regeneración defectuosa y neuroinflamación, contribuyendo al desarrollo del dolor neuropático (De Logu et al., 2017, 2019; Gonçalves et al., 2017).

En los ganglios, las **células satelitales** forman envolturas en anillo alrededor de los somas neuronales y se activan en respuesta a una lesión o a estímulos nocivos persistentes (Fig. 6) (Hanani, 2005). A través de señales que se originan en las propias neuronas sensoriales (Luo et al., 2012), las células satelitales sufren cambios estructurales y funcionales, como el incremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (**GFAP**) y de la conexina-43 que favorece la formación de *gap junctions* (Belzer & Hanani, 2019), facilitando la comunicación intercelular y la propagación de señales inflamatorias. Además, secretan citoquinas como **TNF α** , **IL-1 β** e **IL-6**, así como ATP y prostaglandinas, que activan receptores en las neuronas sensoriales, aumentando su excitabilidad y contribuyendo a la sensibilización periférica.

Además, a través de la activación de la vía pro-inflamatoria regulada por el factor de transcripción **NF κ B**, las células satelitales producen quemoquinas que favorecen la infiltración de macrófagos (Lim et al., 2017), y a su vez, el TNF α liberado por **macrófagos** induce en células satelitales una disminución en la expresión del canal de potasio Kir4.1, implicado en la **homeostasis del potasio extracelular** y por ende en la regulación de la excitabilidad neuronal en ganglios raquídeos (Silva et al., 2017).

Las **células del sistema inmune**, incluyendo mastocitos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos T, contribuyen a la sensibilización tanto periférica como central (Fig. 6). Aunque inicialmente se pensó que estos mecanismos eran más relevantes en trastornos de dolor inflamatorio, ahora está claro que los estados de dolor neuropático también están asociados con una considerable infiltración de células inmunes en nervios y ganglios (Finnerup et al., 2021). Un tipo celular particularmente importante en este contexto son los **macrófagos**. Una gran cantidad de evidencia respalda su papel en la fisiopatología del dolor neuropático (De Logu et al., 2017; Trevisan et al., 2016; Yu et al., 2020), con diferentes subtipos desempeñando roles distintos en la sensibilización. Mientras que los macrófagos M1 promueven la sensibilización, macrófagos M2 la inhiben y favorecen la reparación tisular (De Logu et al., 2017; Trevisan et al., 2016; Yu et al., 2020).

A nivel espinal **los astrocitos y la microglía** participan activamente en la amplificación de la actividad de los circuitos nociceptivos (Fig. 6) (Finnerup et al., 2021). Tras una lesión o daño, la actividad patológica en las aferencias periféricas conduce a la liberación de ATP y el factor estimulante de colonias 1 (CSF1) desde las terminales centrales, lo que activa la **microglía**, induciendo proliferación y cambios morfológicos (Guan et al., 2016). Los cambios en el perfil transcripcional y secretor de la microglía, incluyendo la liberación de TNF α , interleuquinas,

fractalquina, ATP y quemoquinas, han sido asociados a dolor neuropático. Se ha postulado que esta cascada neuroinflamatoria se amplifica mediante el reclutamiento de más microglía y, eventualmente, de **astrocitos** vecinos, los cuales también liberan mediadores pro-inflamatorios (Fig. 6). La activación de astrocitos promueve aún más la actividad neuronal, mediante el aumento en la síntesis de prostaglandinas, la desregulación de la recaptación de glutamato, la modulación del estado bioenergético de las neuronas (Finnerup, 2017) y la secreción de D-serina, que potencia la función del receptor NMDA en neuronas espinales, favoreciendo así la sensibilización central (Ji et al., 2016; Moehring et al., 2018).

Dado que estas interacciones bidireccionales glia-neurona perpetúan la sensibilización central contribuyendo a mantener el estado de hipersensibilidad característico del dolor neuropático, existe un enorme potencial terapéutico en la modulación de células gliales y sus mediadores para el tratamiento de este dolor crónico.

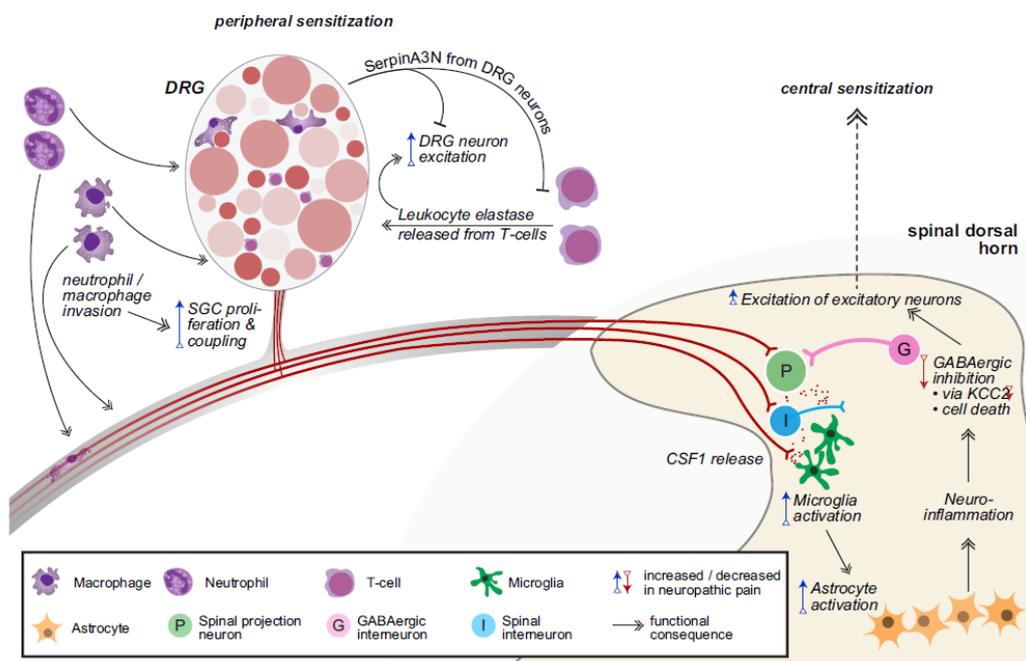


Figura 6. Contribución de los procesos neuroinflamatorios periféricos y centrales al desarrollo de dolor neuropático. En el esquema se destaca el rol de células del sistema inmune, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos, y de células gliales como las células satelitales en el ganglio y los astrocitos y la microglía en la médula. Imagen tomada de (Finnerup et al., 2021).

En resumen, los mecanismos de sensibilización periférica y central subyacen a las manifestaciones clínicas más características del dolor neuropático, tales como la disestesia, la alodinia y la hiperalgesia. Una vez instaurados, estos procesos neuroplásticos contribuyen a la cronificación del dolor, haciéndolo persistente, desproporcionado al estímulo original y resistente a los tratamientos analgésicos convencionales. Esta refractariedad terapéutica representa uno de los principales desafíos en el abordaje clínico del dolor neuropático y justifica la necesidad de continuar investigando sus mecanismos subyacentes para el desarrollo de estrategias más efectivas y personalizadas.

1.2.3 Evaluación de dolor en pacientes y en modelos animales

Como se ha mencionado en secciones anteriores, el dolor constituye una experiencia sensorial y emocional compleja (Raja et al., 2020), en la que confluyen componentes sensitivos-discriminativos junto con dimensiones emocionales y afectivas. En este sentido, el dolor es una experiencia subjetiva, única para cada individuo, y no existen métodos que permitan cuantificarlo de manera objetiva ni en humanos ni en animales (Giordano et al., 2010). En pacientes, la **evaluación de dolor** se basa en el **autoreporte**, utilizando escalas como la Escala Visual Analógica, la Escala Numérica o la Escala de Calificación Verbal, las cuales dependen de la capacidad del individuo para comunicar su percepción del dolor (Hawker et al., 2011; Williamson & Hoggart, 2005). En el ámbito pediátrico, se emplean escalas adaptadas por edad: para los niños mayores, la escala numérica; y para los más pequeños, escalas de caras (Birnie et al., 2019; Trottier et al., 2022). Para niños menores de 3 años, o aquellos que, por diversas razones, no pueden responder con autoreporte, se utiliza la escala FLACC (Face, Legs, Activity, Cry, Consolability) (Trottier et al., 2022). Esta escala pone en manos del profesional la observación de cinco **indicadores conductuales** que permiten identificar, cuantificar y monitorizar el dolor en pacientes no verbales o preverbales, facilitando una valoración clínica eficaz basada en signos visibles de malestar (Birnie et al., 2019; Trottier et al., 2022).

Salvando las distancias, en los modelos experimentales (generalmente en ratones y ratas) se emplean pruebas que evalúan **signos o comportamientos indicativos de dolor**. Esos métodos, estandarizados y validados, son ampliamente utilizados en el campo de la investigación preclínica en dolor y permiten inferir la presencia y magnitud del dolor a partir de signos, síntomas y respuestas motoras, reflejas y afectivas (Mogil, 2009). Entre los métodos más empleados se encuentran aquellos que implican la aplicación de un estímulo controlado y la evaluación de conductas de retirada de una extremidad, frecuentemente acompañadas por comportamientos más complejos vinculados a dolor (Mogil, 2009). Estos estudios comportamentales permiten evaluar diferentes condiciones de dolor, dependiendo del contexto experimental: mientras que en condiciones fisiológicas la aplicación de estímulos nocivos permite evaluar nocicepción, en contextos patológicos, la exposición a estímulos inocuos o nocivos puede revelar la presencia de alodinia o hiperalgesia, respectivamente (Deuis et al., 2017a; Mogil, 2009), indicando un estado de sensibilización. Además de estas pruebas basadas en estímulos en las que se evalúa **dolor inducido**, se han desarrollado abordajes que permiten detectar **dolor espontáneo**, en ausencia de estimulación externa. En este caso, se evalúan alteraciones en el comportamiento natural del animal, como la disminución de la locomoción o del acicalamiento, o cambios en la ingesta o las actividades exploratorias, que pueden reflejar la presencia de dolor.

A continuación, se mencionan los métodos más utilizados para evaluar alodinia, hiperalgesia y cambios en el comportamiento natural de los animales (ver Fig. 7).

Pruebas de sensibilidad mecánica:

- **Test de Von Frey:** Utiliza filamentos de distinto gramaje que ejercen una presión constante y que permiten determinar el umbral de respuesta a estímulos mecánicos, (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1980). A pesar del desarrollo de pruebas electrónicas, el

método manual de Von Frey sigue siendo el estándar de oro para la determinación de los umbrales mecánicos en roedores (Deuis et al., 2017).

- **Test de presión de Randall-Selitto:** Se aplica presión progresiva sobre la extremidad hasta la manifestación de una respuesta de retirada (Randall and Selitto, 1957).

Pruebas de sensibilidad térmica:

- **Test de Choi:** Evalúa la sensibilidad al frío mediante la aplicación de una gota de acetona en la superficie plantar. La evaporación rápida del líquido provoca un descenso local de temperatura (~15 °C), y se registra la respuesta nocifensiva del animal (Choi et al., 1994).
- **Test de placa caliente:** Mide el tiempo de reacción del animal a una superficie caliente, con posibilidad de aplicar temperaturas en el rango inocuo o nocivo (Woolfe and Macdonald, 1944).
- **Test de inmersión de la cola:** Evalúa la latencia de retirada de la cola en respuesta a un estímulo térmico aplicado en su extremo (D'amour and Smith, 1941).
- **Test de Hargreaves:** Determina la latencia de retirada de la extremidad posterior ante un estímulo térmico focalizado de calor nocivo (Hargreaves et al., 1988).

Pruebas de comportamiento espontáneo y afectivo:

- **Ultrasonidos y expresión facial:** En condiciones de dolor, ratones y ratas emiten vocalizaciones ultrasónicas y muestran cambios en la expresión facial (Langford et al., 2010). Su determinación permite inferir la presencia de dolor espontáneo.
- **Aspecto y peso:** La pérdida de peso corporal y los cambios en el aspecto general — como el pelaje erizado, la presencia de placas alopécicas, la postura encorvada o la retracción de las extremidades son indicadores de malestar o dolor. Estos parámetros, aunque inespecíficos, son útiles para evaluar el impacto del dolor sobre el estado general del animal (Roughan & Flecknell, 2001; Vierck et al., 2008).
- **Cámara de actividad y campo abierto:** Permiten detectar cambios en la locomoción y ansiedad, que pueden estar asociados con dolor (Harte et al., 2016).
- **Condicionamiento de lugar aversivo:** Evalúa el componente afectivo del dolor, analizando la evitación de un ambiente previamente asociado con estímulos nocivos (King et al., 2009).

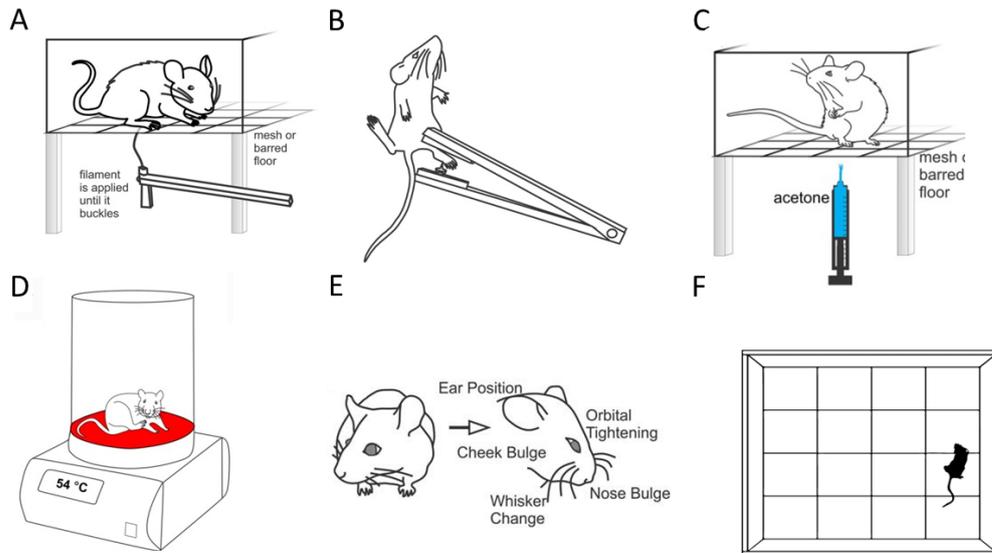


Figura 7. Métodos utilizados para evaluar comportamientos indicativos de dolor en animales de experimentación. A) Test de Von Frey, B) Test de Randall-Sellito, C) Test de Choi, D) Test de placa caliente, E) Test de expresión facial, F) Test de Campo Abierto (exploración).

Estas pruebas conductuales han demostrado ser herramientas valiosas para avanzar en la comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso de nocicepción y en el desarrollo y mantenimiento del dolor patológico, así como para evaluar tratamientos farmacológicos y no farmacológicos (Basbaum et al., 2009; Mogil, 2009).

En conclusión, aunque el dolor no puede medirse objetivamente, los métodos conductuales mencionados ofrecen **herramientas confiables y estandarizadas** para evaluarlo en modelos animales. La reproducibilidad y confiabilidad de estos ensayos han sido validadas en modelos de dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático (Gregory et al., 2013; Mogil, 2019). La **combinación de múltiples pruebas** permite caracterización en forma más completa el cuadro de dolor, facilitando la traslación de hallazgos preclínicos a la práctica clínica (Tappe-Theodor & Kuner, 2014; Vierck et al., 2008). En este trabajo de tesis se utilizó el test de Von Frey para evaluar alodinia mecánica, el test de Choi para estudiar alodinia térmica al frío, la evaluación de aspecto, peso corporal y consumo de alimento como indicadores de dolor espontáneo, y la prueba de campo abierto para analizar parámetros asociados a locomoción, como se explicará con mayor detalle en la sección de Materiales y Métodos.

1.3 Mecanismos de acción antitumoral y efectos neurotóxicos del oxaliplatino

1.3.1 Acción antitumoral

Antes de abordar los efectos neurotóxicos inducidos por el quimioterápico, es importante mencionar brevemente los mecanismos involucrados en su acción antitumoral, ya que ambos están relacionados. Es decir, las **acciones citotóxicas** que subyacen a sus efectos antitumorales pueden afectar también a células sanas, incluidas aquellas del SN, contribuyendo así a la neurotoxicidad (Park et al., 2008).

El oxaliplatino es un agente citostático de tercera generación a base de platino utilizado como tratamiento de primera línea contra el cáncer colorrectal, gástrico y pancreático (Branca et al., 2021; Calls et al., 2020). En el caso particular del CCR, el oxaliplatino se administra generalmente en combinación con 5-fluorouracilo —denominado esquema **FOLFOX**— o con capecitabina —denominado esquema **XELOX**—, lo cual potencia su actividad antitumoral (Guo et al., 2016). Estos agentes antineoplásicos no generan neurotoxicidad.

El principal mecanismo de acción antitumoral del oxaliplatino está mediado por su **unión al ADN**, formando aductos platino-ADN con diferentes tipos de entrecruzamientos: (i) enlaces cruzados intrahebra de ADN, (ii) enlaces cruzados interhebra de ADN, y (iii) enlaces cruzados ADN-proteína (Arango et al., 2004; Calls et al., 2022). El mecanismo predominante es el enlace cruzado intrahebra de ADN, con la formación de aductos entre dos residuos de guanina o entre residuos de guanina y adenina, que interfieren con la replicación y transcripción (Calls et al., 2020; Martínez-Balibrea et al., 2015). De este modo, la exposición de las células tumorales a oxaliplatino genera cambios estructurales irreversibles en el ADN, desencadenando muerte celular programada o apoptosis (Arango et al., 2004; Branca et al., 2021).

Las cascadas de señalización que conducen a **apoptosis** pueden dividirse en dos grandes grupos, la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca se caracteriza por el papel central de las mitocondrias en la iniciación de la cascada de caspasas que ejecuta el programa apoptótico (Desagher & Martinou, 2000). Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 desempeñan un papel fundamental (Gross et al., 1999; Narita et al., 1998). Ante ciertos estímulos, los miembros proapoptóticos como Bax que normalmente residen en el citosol, se relocalizan en la membrana mitocondrial externa donde promueven la liberación de factores apoptóticos, la activación de caspasas y la muerte celular (Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Por el contrario, en la vía extrínseca, la activación de caspasas es iniciada por los receptores de muerte en la superficie celular (Ashkenazi & Dixit, 1998). Se ha demostrado que el oxaliplatino provoca la traslocación de Bax a las mitocondrias, la liberación de citocromo c al citosol y la activación de caspasa 3, eventos consistentes con la inducción de la vía intrínseca (Arango et al., 2004; Martínez-Balibrea et al., 2015).

Además, los efectos antitumorales del oxaliplatino involucran la **activación del sistema inmune**. Se ha demostrado que cuando las células de cáncer colorrectal CT26 son tratadas con oxaliplatino pueden liberar señales inmunogénicas que desencadenan una fuerte respuesta inmune, potenciando el efecto anticancerígeno (Tesniere et al., 2010).

De este modo, a través del daño al ADN, la inducción de la apoptosis y la activación del sistema inmune, el oxaliplatino ejerce potentes efectos citotóxicos que se traducen en su efectividad antitumoral.

1.3.2 Efectos neurotóxicos

A diferencia de otros derivados del platino, el oxaliplatino no presenta nefrotoxicidad ni ototoxicidad significativas pero produce otros efectos adversos, siendo el principal la **neurotoxicidad periférica**, factor limitante en su uso clínico (Branca et al., 2021).

Como se mencionó en la sección anterior, el quimioterápico ejerce su efecto antitumoral principalmente a través de la formación de enlaces covalentes con el ADN (Arango et al., 2004). Esta acción no se limita a las células tumorales, sino que también afecta a otros tipos celulares, incluidas las neuronas aferentes primarias (Branca et al., 2021). Se ha demostrado que la acumulación de compuestos de platino y la formación de **aductos de platino en el ADN**, son eventos clave en el desarrollo de neurotoxicidad (Wei et al., 2021). Los **ganglios de la raíz dorsal** presentan una **elevada permeabilidad** debido a su red capilar con fenestraciones abundantes y a la ausencia de una barrera hemato-neural (Kang et al., 2021; Wei et al., 2021). Además, las neuronas aferentes primarias expresan transportadores de membrana específicos, como el transportador de cationes orgánicos que facilitan el ingreso del quimioterápico (Fujita et al., 2019), facilitando su acumulación y el daño estructural y funcional (Fig. 8) (Kang et al., 2021).

Otro mecanismo crucial en la neurotoxicidad inducida por oxaliplatino es la **disfunción mitocondrial** (Fig. 8) (Branca et al., 2021; Kang et al., 2021). El antineoplásico se une al ADN mitocondrial con una afinidad similar a la que presenta por el ADN nuclear, afectando su replicación y transcripción (Kang et al., 2021). Como consecuencia, se altera la expresión de proteínas mitocondriales y se generan cambios morfológicos, interrupción de la cadena de transporte de electrones, reducción de la producción de ATP y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kang et al., 2021). En estudios experimentales *in vitro* se ha demostrado que el oxaliplatino aumenta los niveles de ROS, en particular el anión superóxido, así como la carbonilación de proteínas, sugiriendo que el estrés oxidativo desempeña un papel central en su toxicidad neuronal (Fig. 8) (Branca et al., 2021).

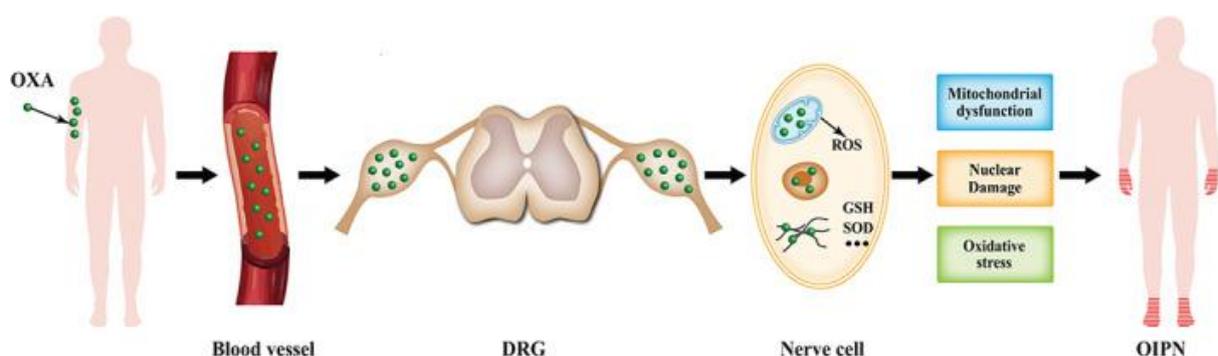


Figura 8. Una vez que el oxaliplatino (OXA) ingresa a la circulación sistémica, se acumula en los ganglios de la raíz dorsal que carecen de la protección de la barrera hematoencefálica, desencadenando daño nuclear, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo y conduciendo al desarrollo de la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino. Tomado de (Wei et al., 2021).

Otro mecanismo involucrado en la neuropatía inducida por oxaliplatino es la **disfunción de canales iónicos**, incluidos los canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje, así como los receptores de la familia TRP (Kang et al., 2021). El oxalato, metabolito del oxaliplatino, altera la función de los canales de sodio, prolongando su estado abierto y generando hiperexcitabilidad en neuronas aferentes primarias (Grolleau et al., 2001). Asimismo, el oxaliplatino induce alteraciones funcionales en los canales de potasio dependientes de voltaje y un aumento en la expresión de canales de potasio pro-excitatorios, como aquellos activados por hiperpolarización (HCNs) (Descoeur et al., 2011; Kagiava et al., 2008). Existe evidencia experimental que indica que el oxaliplatino regula positivamente la expresión de canales TRP en neuronas de ganglios de la raíz dorsal en cultivo, lo que sugiere un papel adicional en la sensibilización neuronal (Kang et al., 2021). La disfunción de estos canales iónicos conduce a hiperexcitabilidad y descargas ectópicas, y puede manifestarse clínicamente como parestesias, disestesias y dolor (Gomez-Barrios & Tortorici, 2009).

Finalmente, en los últimos años se ha propuesto a la **neuroinflamación** como un factor relevante en la fisiopatología de la neuropatía por quimioterápicos, con características diferenciales según el fármaco (Fumagalli et al., 2021). En estudios recientes se ha demostrado la participación de células del sistema inmune, con producción y secreción de citoquinas y quemoquinas, que podrían contribuir a la hiperexcitabilidad neuronal (Branca et al., 2021; Kang et al., 2021). Además, se ha postulado que células gliales como las de Schwann en el nervio, las satelitales gliales en los ganglios, y la microglía y los astrocitos en la médula espinal desempeñan un papel importante en el desarrollo de la NPIQ (Branca et al., 2021).

En resumen, en los últimos años se han identificado diversos mecanismos celulares y moleculares implicados en la neurotoxicidad inducida por oxaliplatino, los cuales podrían contribuir al desarrollo de alteraciones sensitivas y dolor neuropático. No obstante, estos mecanismos aún no han sido completamente elucidados. Una **comprensión más profunda** de estos procesos es fundamental para identificar mediadores clave y avanzar en el diseño de estrategias preventivas y terapéuticas. Dado que la neurotoxicidad limita significativamente la calidad de vida de los pacientes y puede condicionar la continuidad del tratamiento oncológico, el estudio de estos mecanismos representa un objetivo prioritario en la investigación traslacional del dolor inducido por quimioterapia.

En este sentido, en las últimas décadas se han establecido con éxito **modelos preclínicos** de neuropatía inducida por una variedad de fármacos quimioterápicos neurotóxicos, incluyendo paclitaxel (Boehmerle et al., 2014; Chine, Au, Kumar, et al., 2019; Polomano et al., 2001; Siau et al., 2006), vincristina (Boehmerle et al., 2014; Chine et al., 2019; Siau et al., 2006), cisplatino (Boehmerle et al., 2014; Joseph & Levine, 2009), oxaliplatino (Kalemci et al., 2019a; W. H. Xiao et al., 2012) y bortezomib (Boehmerle et al., 2014; Meregalli et al., 2010). La mayoría de los estudios, realizados en roedores, implementa protocolos de dosificación que buscan replicar los regímenes clínicos de quimioterapia, mediante administraciones repetidas por vía intraperitoneal o intravenosa (Höke & Ray, 2014). En los modelos de NPIO la administración del quimioterápico se realiza habitualmente en esquemas que incluyen tres inyecciones en días alternos o cinco inyecciones en días consecutivos. Las dosis individuales suelen ser de 2 o 4 mg/kg, alcanzando dosis acumuladas de 10-12 mg/kg (Illias et al., 2022; Shao et al., 2023; Wagner et al., 2024; Xiao et al., 2012). El esquema utilizado en esta tesis, que se detallará en la sección de Materiales y Métodos, se diseñó en base a estos trabajos previos.

1.4 Diferencias asociadas al sexo

1.4.1 En la prevalencia y severidad de cuadros de dolor persistente

El dolor crónico es uno de los problemas de salud más prevalentes en los seres humanos, afectando a más de una cuarta parte de la población mundial (Zimmer et al., 2021) y su incidencia continúa en aumento, en gran parte debido al envejecimiento poblacional. Llamativamente, **las mujeres están sobrerrepresentadas entre los pacientes con dolor crónico**. Por razones obvias, varios síndromes de dolor persistente afectan exclusivamente a mujeres, incluyendo la endometriosis, la vulvodinia y el dolor menstrual. Sin embargo, algunos síndromes de dolor crónico altamente prevalentes que pueden afectar a ambos sexos como el síndrome de fatiga crónica, la fibromialgia, la cistitis intersticial y el trastorno temporomandibular, presentan una distribución marcadamente sesgada, con más del 80% de los casos reportados en mujeres (Fillingim et al., 2009; Mogil, 2012). Por último, los síndromes de dolor crónico con mayor prevalencia a nivel global —cefalea, migraña, dolor lumbar, dolor cervical y dolor de rodilla— muestran una clara predominancia en mujeres (Fillingim et al., 2009). Existen, por supuesto, condiciones que cursan con dolor específicas de los hombres (como la prostatitis crónica), dominadas por hombres (como la gota) o con mayor prevalencia en hombres (como la cefalea en racimos), pero en términos generales, estas tienden a ser menos frecuentes (Mogil, 2012).

La mayor presencia de mujeres entre los pacientes con dolor crónico puede explicarse mediante tres postulados no excluyentes entre sí. En primer lugar, las mujeres buscan atención médica con mayor frecuencia que los hombres y/o son más propensas a reportar dolor en encuestas, lo que lleva a una representación más alta en estudios epidemiológicos (Fillingim et al., 2009; Lacasse et al., 2023). En segundo lugar, las mujeres presentan una mayor susceptibilidad a los síndromes de dolor crónico más comunes en comparación con los hombres, lo que aumenta la probabilidad de desarrollar condiciones en las que el dolor es un síntoma central (Fillingim et al., 2009; Keogh, 2022; Mogil, 2012). Por último, las mujeres tienen una mayor sensibilidad y/o una menor tolerancia al dolor en comparación con los hombres, lo que hace que un mayor porcentaje de ellas alcance el umbral en el que la experiencia dolorosa se diagnostica como un “síndrome de dolor” (Fillingim et al., 2009; Keogh, 2022; Mogil, 2012). En este escenario, la severidad del dolor en patologías que afectan a ambos sexos tiende a ser mayor en mujeres.

Esta mayor prevalencia y severidad de dolor clínico en mujeres se debe tanto a **diferencias de género** —es decir, factores socioculturales relacionados con las identidades y roles de género— como a **diferencias de sexo** —es decir, factores biológicos asociados a los efectos directos o indirectos de las hormonas gonadales o los genes—, que se explicarán con mayor detalle en la sección 1.4.2 (Boerner et al., 2018; Mogil, 2012).

Reconociendo la importancia de este tema, la IASP, asociación de referencia en el estudio y tratamiento del dolor, designó al año 2024 como el "**Año Global sobre Disparidades de Sexo y Género en el Dolor**". Esta iniciativa buscó visibilizar la relevancia de estas diferencias en la percepción y modulación del dolor, así como las desigualdades en la investigación y el acceso a tratamientos. A lo largo del año, la IASP promovió la difusión del conocimiento actual sobre

estas disparidades, exploró los factores que las explican y propuso estrategias para reducirlas (<https://www.iasp-pain.org/resources/fact-sheets/156455/>).

Una de las recomendaciones derivadas de esta iniciativa fue la de incluir **animales de ambos sexos** en los estudios preclínicos de dolor persistente. Aunque la mayoría de los pacientes con dolor crónico son mujeres, los estudios preclínicos sobre la fisiopatología del dolor crónico se han llevado a cabo predominantemente en roedores macho (Mogil, 2020; Mogil & Chanda, 2005). Esto ha limitado el desarrollo de terapias optimizadas para cada sexo, lo que refuerza la urgencia de adoptar un enfoque más equitativo en la investigación traslacional del dolor.

1.4.2 En los mecanismos que subyacen al dolor persistente

La reciente implementación por parte de diversas agencias de financiamiento de políticas que exigen la incorporación del sexo como una variable biológica en la investigación preclínica ha coincidido con un aumento en el número de estudios que investigan las **diferencias sexuales en el dolor y la analgesia** (Mogil, 2020; Mogil et al., 2024; Osborne and Davis, 2022). Cada vez hay mayor evidencia de que existen diferencias en los mecanismos genéticos, moleculares y celulares involucrados en el procesamiento del dolor crónico en ambos sexos (Mogil, 2020; Mogil et al., 2024; Osborne and Davis, 2022).

Las diferencias asociadas al sexo en los mecanismos que subyacen al dolor persistente reflejan la existencia de variaciones en la neurobiología, la modulación hormonal y la respuesta neuro-inmune (Mogil et al., 2024). A nivel de la **función neuronal**, se ha demostrado que existen diferencias en la expresión de neurotransmisores y receptores, con una mayor activación del sistema opioide endógeno en los hombres (Zubieta et al., 2002) y del receptor glutamatérgico NMDA en las mujeres (Dong et al., 2007). Las **hormonas sexuales** también influyen en la percepción del dolor: estrógeno, progesterona y testosterona modulan las vías de procesamiento nociceptivo y los procesos inflamatorios (Craft, 2007). Mientras que los estrógenos pueden ejercer efectos tanto pro- como anti-nociceptivos (Smith et al., 2006), la progesterona y la testosterona ejercen preferentemente acciones analgésicas (Bartley & Fillingim, 2013; Craft, 2007). A nivel **neuro-inmune**, se ha observado que mientras que en las hembras los macrófagos y linfocitos T desempeñan un papel más relevante en la sensibilización central (Sorge et al., 2015), en los machos los mecanismos de cronificación del dolor dependen en mayor medida de la activación de la microglía espinal (Sorge et al., 2015).

Estas diferencias también se reflejan en la **modulación del dolor**, ya que las mujeres parecieran presentar una mayor actividad en los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico (Shen et al., 2023). Además, en estudios de neuroimagen se sugiere una mayor activación de la amígdala en ellas, mientras que en los hombres predomina la actividad del córtex prefrontal (Kano et al., 2013). En términos clínicos, estas diferencias pueden influir incluso en la eficacia de los tratamientos (Fillingim et al., 2009).

En relación al rol de las **hormonas sexuales**, se ha demostrado que la severidad del dolor fluctúa a lo largo del ciclo menstrual (Bajaj et al., 2001). Esta fluctuación se hace aún más evidente en mujeres con dolor crónico, posiblemente debido a un desbalance entre mecanismos amplificadores e inhibidores del dolor. Además, la administración de hormonas en anticonceptivos orales o en terapias de reemplazo hormonal aumenta el riesgo de ciertos

cuadros de dolor persistente (Athnail et al., 2023). Por su parte, en hombres con bajos niveles de testosterona y dolor crónico, la administración de esta hormona reduce la intensidad del dolor (Kato et al., 2020).

En relación a las **interacciones neuroinmunes**, se ha propuesto que el papel de las **células microgliales** en la cronificación del dolor depende del sexo del individuo (Ghazisaeidi et al., 2023). Tras una lesión periférica, la microglía se activa en animales de ambos sexos, pero su inhibición o eliminación revierte la hipersensibilidad únicamente en machos (Mapplebeck et al., 2018; Saika et al., 2020; Sorge et al., 2015), resaltando su rol protagónico en este sexo. Además, la activación de **células inmunes** residentes y la infiltración de inmunocitos en nervios y ganglios tras una lesión contribuyen a la hipersensibilidad en ambos sexos aunque los mecanismos de modulación del dolor difieren. En las hembras, el sistema inmune adaptativo—mediante la activación e infiltración de linfocitos T CD4⁺—juega un papel relevante tanto a nivel del SNP (Hartlehnert et al., 2017; Lopes et al., 2017) como del SNC (Sorge et al., 2015). Sin embargo, cuando se inhiben los mecanismos inmunes, son capaces de activar una vía dependiente de la microglía (Guo et al., 2019; Sorge et al., 2011, 2015). Además, se ha observado que únicamente en hembras se produce infiltración de mastocitos en la duramadre espinal en condiciones de dolor inflamatorio (Xanthos et al., 2011).

El creciente reconocimiento de las diferencias sexuales en los mecanismos de dolor ha abierto nuevas oportunidades para el desarrollo de tratamientos más específicos y eficaces según el sexo (Osborne & Davis, 2022). La evidencia clínica indica que la modulación selectiva de ciertos procesos biológicos puede beneficiar de manera diferenciada a cada sexo (Mogil et al., 2024), como se ha observado con los fármacos dirigidos a la vía del **CGRP** en la migraña (Porreca & Dodick, 2023). En este contexto, la señalización de este péptido pronociceptivo ha demostrado un rol predominante en hembras (Avona et al., 2019) lo que se traduce en una mayor eficacia de los tratamientos dirigidos a esta vía en mujeres (Porreca & Dodick, 2023). De manera similar, la **prolactina**, que actúa como modulador de los canales TRPV1, TRPA1 y TRPM8 (Patil et al., 2013), se ha identificado como mediador clave en la sensibilización nociceptiva particularmente en hembras, lo que sugiere que podría representar un blanco prometedor para el manejo del dolor crónico en mujeres (Chen et al., 2020).

Además de los actores ya mencionados, se ha propuesto un rol diferencial de diversos neurotransmisores, factores inmunológicos, receptores, canales iónicos, transportadores, factores de transcripción y moléculas de señalización intracelular, lo que pone de manifiesto la **complejidad de los mecanismos que subyacen al dimorfismo sexual en la percepción y cronificación del dolor** (Mapplebeck et al., 2018; Mogil et al., 2024; Sorge et al., 2015).

Estos hallazgos sugieren que la activación de vías celulares y moleculares distintas en machos y hembras podría contribuir de manera decisiva a la susceptibilidad diferencial al desarrollo de dolor persistente. En este contexto, resulta fundamental investigar cómo estas diferencias biológicas influyen en el desarrollo de dolor neuropático en el contexto de la NPIQ, aspecto que será abordado específicamente en este trabajo de tesis.

1.4.3 En la prevalencia y severidad de la neuropatía inducida por quimioterapia

En el caso particular de la **neuropatía inducida por quimioterapia**, en los últimos años ha surgido un creciente interés en el estudio de posibles **diferencias asociadas al sexo en su prevalencia y severidad** (Lee et al., 2024). Sin embargo, el número de estudios clínicos realizados es aún escaso, los hallazgos han sido inconsistentes y no se ha alcanzado un consenso. Un estudio realizado en pacientes egipcios con CCR tratados con regímenes basados en oxaliplatino encontró que la incidencia de neuropatía fue similar en hombres y mujeres (Ahmed et al., 2019). No obstante, las mujeres presentaron una mayor frecuencia de síntomas severos con interferencia con actividades de la vida diaria (Ahmed et al., 2019). En contraste, un estudio multicéntrico realizado en pacientes con CCR tratados con regímenes conteniendo oxaliplatino en cuatro centros europeos (2 en Italia, 1 en Grecia y 1 en España) reportó mayor incidencia de neuropatía severa en hombres (Velasco et al., 2014), sugiriendo una mayor vulnerabilidad masculina en ciertos contextos clínicos. Finalmente, dos estudios realizados en Estados Unidos no encontraron diferencias en la prevalencia y severidad (Alejandro et al., 2013; Uwah et al., 2012). La discordancia en los hallazgos probablemente se deba a que una amplia variedad de factores influye en el desarrollo de la NPIQ, incluyendo el número de ciclos de quimioterapia, la dosis acumulada y los antecedentes de neuropatía, entre otros (Molassiotis et al., 2019), dificultando el análisis.

Si bien estos estudios sugieren la existencia de **dimorfismo sexual en la NPIQ**, la existencia de una presentación clínica diferencial no se ha confirmado aún. Las diferencias en los procesos farmacocinéticos y la influencia de factores hormonales podrían generar una susceptibilidad diferencial a los efectos neurotóxicos (Jeffrey & Huang, 2007). Además, factores como la expresión diferencial de canales iónicos o de mediadores del proceso neuroinflamatorio podrían estar involucrados (Descoeur et al., 2011b; Was et al., 2022). Dado el impacto clínico de la NPIQ y la incertidumbre sobre el papel del sexo en su desarrollo, la presente tesis dedica secciones específicas al estudio de las diferencias sexuales tanto en la presentación clínica como en los procesos neurotóxicos inducidos por oxaliplatino. Comprender estos mecanismos podría contribuir al desarrollo de estrategias personalizadas para prevenir y tratar la NPIQ en función del sexo del paciente.

1.4.4 En los mecanismos que subyacen a la neurotoxicidad de los quimioterápicos

La existencia de **dimorfismos sexuales en la fisiopatología de la NPIQ** recién ha comenzado a investigarse, por lo que la evidencia disponible es aún muy limitada. En un estudio *in vitro* en el que se evaluó mediante electrofisiología la actividad de neuronas sensoriales expuestas a paclitaxel se observó que las neuronas obtenidas a partir de hembras presentaron mayor excitabilidad y actividad espontánea (Villalba-Riquelme et al., 2022). Por otro lado, una investigación realizada por Luo y colaboradores identificó que, en macrófagos, el receptor tipo Toll 9 (TLR9) contribuye al desarrollo de dolor por paclitaxel específicamente en ratones macho, evidenciando diferencias sexuales en la respuesta inmune periférica (Luo et al., 2019). Además, se ha descrito un marcado **dimorfismo en los mecanismos neuroendócrinos** que exacerbaban el dolor inducido por oxaliplatino (Staurengo-Ferrari et al., 2021) y paclitaxel (Ferrari et al., 2020) en situaciones de estrés. Finalmente, dada la rápida transformación del oxaliplatino en metabolitos tóxicos es importante considerar que **diferencias asociadas al**

sexo en parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos podrían influir en la severidad de los efectos neurotóxicos y del dolor neuropático asociado (Özdemir et al., 2022).

A nivel comportamental, se han identificado algunas **diferencias en el desarrollo de hipersensibilidad**, luego de la exposición a ciertos quimioterápicos. En un modelo de neuropatía inducida por paclitaxel, se observó que la alodinia al frío fue más intensa y de aparición más temprana en hembras (Naji-Esfahani et al., 2016). Sin embargo, el desarrollo de alodinia mecánica no mostró diferencias entre sexos (Hwang et al., 2012), lo que sugiere la participación de mecanismos específicos según el tipo de estímulo nociceptivo. Por otro lado, en la neuropatía inducida por cisplatino, no se han observado diferencias significativas entre machos y hembras en la alodinia ante estímulos mecánicos y térmicos fríos (Naji-Esfahani et al., 2016), indicando que la magnitud de la sensibilización en cada sexo podría depender también del agente quimioterapéutico utilizado.

Estas diferencias en el desarrollo de conductas asociadas a dolor resaltan la importancia de considerar el sexo como un factor biológico relevante al estudiar la NPIQ. A pesar de su impacto en la práctica clínica, las diferencias asociadas al sexo en los efectos adversos de los quimioterápicos han sido poco exploradas (Rakshith et al., 2023). En este contexto, destaca la necesidad de investigaciones, tanto clínicas como preclínicas, que permitan comprender mejor cómo el sexo del individuo influye en el desarrollo y la severidad de la NPIQ.

1.5 Efectos neuroprotectores del resveratrol

Otro aspecto aún no resuelto en el contexto de la NPIQ, es la carencia de **estrategias que permitan prevenir o revertir la neuropatía y los síntomas asociados**. En el tratamiento del dolor, fármacos como la duloxetina y la pregabalina, empleados comúnmente en otras condiciones de dolor patológico, pueden ofrecer cierto alivio; sin embargo, su eficacia es moderada y limitada a un subgrupo de pacientes. Además, dado que estos tratamientos son únicamente sintomáticos y no abordan los cambios maladaptativos que ocurren en el SN, el dolor reaparece si se suspenden las terapias (Hershman et al. 2014; Majithia et al. 2016; Bakogeorgos and Georgoulis 2017; Ibrahim and Ehrlich 2020). La identificación de **agentes neuroprotectores** capaces de prevenir o revertir los procesos neurotóxicos inducidos por quimioterápicos, y con ello mitigar los síntomas asociados, representa una estrategia alternativa y, posiblemente, más eficaz. En línea con los enfoques terapéuticos actuales orientados al desarrollo de fármacos modificadores de enfermedad, es decir, intervenciones que no se limitan al alivio sintomático, sino que apuntan a modificar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes para detener, ralentizar o incluso revertir la progresión del daño.

En este contexto, se ha demostrado que el **resveratrol** (trans 3,5,4'-trihidroxiestilbeno), un polifenol natural producido por diversas plantas y frutas —especialmente uvas, frutos rojos y maní (Burns et al., 2002; Tian & Liu, 2020)—, posee efectos neuroprotectores y antialodínicos en diversos modelos experimentales de lesiones del SN y/o de dolor persistente. En particular, se ha comprobado que el resveratrol ejerce potentes efectos anti-inflamatorios (Kumar and Sharma 2010; Tao et al. 2016; Yang et al. 2016) y antioxidantes (Kumar et al., 2013), además de reducir significativamente el dolor en animales con neuropatía diabética (Kumar et al.,

2013), lesión por constricción crónica del nervio ciático (Tao et al., 2016) o neuralgia del trigémino (Yang et al., 2016).

Durante décadas, el resveratrol —especialmente presente en altas concentraciones en el vino tinto (Castaldo et al., 2019)— ha despertado un notable interés, por sus efectos cardioprotectores y antioxidante (Wu & Hsieh, 2011; Zordoky et al., 2015). Hoy su uso como suplemento dietario es habitual y, en los últimos años, ha despertado un creciente interés debido a su prometedor rol en el tratamiento de diversas patologías (Berman et al., 2017; Singh et al., 2019). De hecho, sus propiedades farmacocinéticas, de seguridad y de eficacia han sido evaluadas en más de 250 ensayos clínicos, en los que se ha reportado que **el polifenol ejerce una amplia variedad de efectos beneficiosos en pacientes con diferentes condiciones**, desde obesidad y enfermedades cardiovasculares hasta infarto cerebral y enfermedad de Alzheimer, gracias a su capacidad para modular múltiples vías de comunicación intracelular (Berman et al., 2017; Singh et al., 2019).

En el contexto de lesiones del SN, se ha demostrado que sus diversas acciones biológicas —incluidas las propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antiapoptóticas— confieren además **efectos neuroprotectores** en distintos modelos experimentales (Coyoy-Salgado et al., 2019; Lopez et al., 2015; Pietro et al., 2020; Xu et al., 2020). Sus efectos pleiotrópicos sobre el estrés oxidativo, la neuroinflamación, la autofagia y la apoptosis han sido demostrados en modelos de injuria cerebral traumática (Feng et al., 2016; Shi et al., 2018) y de contusión medular (Liu et al., 2019; Meng et al., 2018; Wang et al., 2018), destacando su capacidad de reducir el daño secundario y el deterioro funcional.

Dado que se ha reportado que el **oxaliplatino** induce toxicidad mitocondrial y aumento en los niveles de ROS (Branca et al., 2021) y que el estrés oxidativo genera toxicidad neuronal pudiendo contribuir al dolor, resulta razonable plantear que el resveratrol, al modular estos procesos patológicos, podría reducir los efectos neurotóxicos desencadenados por el quimioterápico.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis doctoral, propusimos evaluar si la administración de resveratrol lograba prevenir o revertir los comportamientos asociados a dolor en animales expuestos al quimioterápico, e investigar sus efectos sobre los procesos de estrés y daño oxidativo, mecanismos de defensa antioxidante y procesos neuroinflamatorios en diferentes estructuras de la vía nociceptiva.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La hipótesis de trabajo plantea que la administración de oxaliplatino inducirá una neuropatía tóxica, caracterizada por alteraciones moleculares y cambios funcionales de las neuronas aferentes primarias, con desarrollo de dolor neuropático y un perfil diferencial según el sexo. Además, la administración sistémica del polifenol natural resveratrol será capaz de prevenir e incluso revertir tanto las alteraciones moleculares como las manifestaciones conductuales, sin interferir con las acciones antitumorales del oxaliplatino.

A nivel clínico, un elevado porcentaje de los pacientes oncológicos tratados con esquemas que incluyen oxaliplatino manifestará síntomas compatibles con neuropatía, tanto durante como después del tratamiento quimioterápico. La prevalencia, la severidad y las características clínicas variarán en función del sexo del paciente, así como de diferentes factores individuales, relacionados al tumor o al tratamiento.

2.2 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar la prevalencia, características clínicas y mecanismos subyacentes a la neuropatía inducida por oxaliplatino, con especial foco en el desarrollo de dolor, analizando diferencias asociadas al sexo y estrategias preventivas y terapéuticas.

Para ello se propone investigar, de manera integrada y complementaria, los efectos neurotóxicos inducidos por el oxaliplatino tanto en modelos experimentales como en pacientes oncológicos, haciendo especial énfasis en el desarrollo de dolor persistente y en la identificación de diferencias asociadas al sexo.

2.3 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de la tesis, organizados por proyecto, son los siguientes:

- 1) Estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el **daño neurotóxico** de las neuronas aferentes primarias tras la administración de oxaliplatino, y determinar si dichos procesos se asocian con el desarrollo de **dolor neuropático (Proyecto I)**.
- 2) Evaluar si los efectos neurotóxicos y las manifestaciones conductuales presentan **diferencias** entre animales de **ambos sexos (Proyecto II)**.
- 3) Analizar si la administración sistémica de **resveratrol** ejerce efectos neuroprotectores, logrando prevenir y revertir las alteraciones moleculares y conductuales inducidas por el quimioterápico, sin interferir con su actividad citotóxica **(Proyecto III)**.
- 4) Estudiar, en una cohorte local de **pacientes** con carcinoma colorrectal **tratados con oxaliplatino**, la prevalencia y severidad de la neuropatía, la existencia de diferencias por sexo, y la asociación con variables demográficas, antropométricas, clínicas y terapéuticas **(Proyecto IV)**.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios preclínicos (Proyectos I, II y III)

3.1 Evaluación por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

Todos los protocolos experimentales que involucraron animales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (protocolos #2020-03, #2020-04).

Dado que este trabajo de tesis doctoral se centró en investigar las alteraciones celulares y moleculares y los cambios conductuales inducidos por oxaliplatino, con especial foco en el desarrollo de dolor y en la evaluación de estrategias neuroprotectoras, la utilización de modelos animales resultó indispensable. No obstante, reconociendo que estas investigaciones implican un grado de sufrimiento de los animales, se buscó refinar el protocolo experimental con el fin de minimizar su malestar. Se implementaron las siguientes medidas para proteger el bienestar animal sin comprometer la validez científica del estudio: cuidado en la manipulación y evaluación, selección de dosis submáximas de oxaliplatino que permitieran inducir neuropatía sin comprometer severamente el estado general del animal, implementación de criterios de punto final humanitario, uso de anestesia cuando fuera pertinente y mantenimiento de condiciones ambientales controladas.

Los procedimientos experimentales adhirieron a las normas bioéticas internacionales y las recomendaciones de la IASP, máximo referente de la investigación en dolor a nivel mundial. Se buscó el cuidado y trato humanitario de los animales desde el momento de su llegada al bioterio y hasta su eutanasia, ofreciendo condiciones adecuadas de alojamiento, control de temperatura (24°C), ciclo de día y noche de 12 horas (h), con acceso *ad libitum* a agua y alimento. El bioterio del IIMT CONICET – Universidad Austral en el que se alojaron los animales durante todo el período de experimentación cuenta con personal técnico altamente capacitado y formado, incluyendo profesionales técnicos de bioterio y veterinarios.

3.2 Animales de experimentación

3.2.1 Ratas

En los proyectos I, II y III se utilizaron ratas adultas de la cepa Sprague Dawley, que fueron incorporadas a los protocolos experimentales a partir de los 35 días de vida, iniciándose el esquema de administración del quimioterápico a los 42 días (200-220gr). En el caso de los proyectos I y III se utilizaron únicamente machos (n=34 animales por grupo experimental), mientras que en el proyecto II se utilizaron machos (n=28 animales por grupo experimental) y hembras (n=28 animales por grupo experimental). Los animales fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, alojados en el bioterio del IIMT CONICET – Universidad Austral, y asignados aleatoriamente a cada grupo experimental antes de iniciar los protocolos experimentales.

3.2.2 Ratones

Además, en el proyecto III se incluyeron ratones Balb-c adultos (15-20gr) de ambos sexos y 5 semanas de vida. Los ratones (n= 6 por grupo experimental) fueron provistos por el bioterio del IIMT CONICET – Universidad Austral y alojados en el mismo. Los animales fueron asignados a los distintos grupos experimentales luego de la inoculación de las células tumorales y del desarrollo del tumor. La asignación se realizó en función del tamaño tumoral, procurando que cada grupo incluyera individuos con un tamaño tumoral promedio comparable, a fin de garantizar la validez de las comparaciones entre grupos.

3.2.3 Grupos experimentales

En el **proyecto I** se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- a) Ratas macho control (CTL)
- b) Ratas macho que recibieron oxaliplatino (OXA)

En el **proyecto II** se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- a) Ratas macho control (CTL)
- b) Ratas macho que recibieron oxaliplatino (OXA)
- c) Ratas hembra control (CTL)
- d) Ratas hembra que recibieron oxaliplatino (OXA)

En el **proyecto III** se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- a) Ratas macho control (CTL)
- b) Ratas macho que recibieron oxaliplatino (OXA)
- c) Ratas macho que recibieron oxaliplatino y resveratrol (OXA+RESV)

- d) Ratones inyectados con células CT26 (CT26)
- e) Ratones inyectados con células CT26 y tratados con oxaliplatino (CT26+OXA)
- f) Ratones inyectados con células CT26 y tratados con oxaliplatino y resveratrol (CT26+OXA+RESV)

3.3 Fármacos

Para llevar a cabo este trabajo de tesis doctoral, los siguientes compuestos se administraron a ratas y a ratones según se especifica en el apartado “Esquemas de administración”:

- **Oxaliplatino** (OXA, Laboratorios Raffo, Argentina): el quimioterápico, generosamente provisto por el Hospital Universitario Austral, fue resuspendido y diluido en solución fisiológica (SF) por personal capacitado, en una cabina de seguridad biológica ubicada en un cuarto con presión de aire negativa. Para ello se contó con la colaboración de las Farm. Vanina Bertozzi, María Laura Torselli y Laura Davide del sector Farmacia del Hospital Universitario Austral. Se prepararon diluciones de 4 mg/ml que se administraron posteriormente a ratas y ratones por vía intraperitoneal (ip), de modo de alcanzar dosis de 4 mg/kg/día en ratas (Shao et al., 2023) y 8 mg/kg/día en ratones (Renn et al., 2011), siendo ambas dosis equivalentes (Nair & Jacob, 2016).

- **Resveratrol** (RESV, Grupo Harmony, Argentina). Se utilizó trans-resveratrol con una pureza del 99%, inicialmente disuelto en etanol absoluto (Biopack) para preparar una solución madre conteniendo 50 mg de resveratrol por cada 1 ml de etanol. Esta solución madre fue fraccionada en viales de 1 ml y almacenada a -30°C . El contenido de cada vial se diluyó en 500 ml o 1000 ml de agua de bebida. Las diluciones resultantes, de 100 mg/L y 50 mg/L respectivamente, fueron colocadas en las mamaderas de las jaulas de ratones y ratas, en reemplazo del agua de bebida habitual (Bhatt et al., 2011). Durante todas las etapas de preparación y administración, el resveratrol y las soluciones obtenidas se protegieron de la luz mediante el uso de envases envueltos en papel metalizado. Además, las soluciones se renovaron cada dos días para asegurar su estabilidad. El resveratrol utilizado en este proyecto fue gentilmente provisto por el Grupo Harmony (Argentina).

3.4 Células tumorales

Se utilizó la línea celular CT26, línea de carcinoma de colon murino, para la inducción de tumores en ratones, en el marco del Proyecto III. Dicha línea celular fue generosamente proporcionada por el Dr. Guillermo Mazzolini y la Dra. Mariana Malvicini. Para proceder al cultivo, se descongeló un criovial conteniendo células CT26, mediante incubación de 1-2 minutos (min) a 37°C en baño de agua. El contenido del vial fue transferido a un tubo cónico de 15 ml que se centrifugó a 300 g por 5 min con el fin de eliminar los restos del dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). A continuación, las células se resuspendieron en 8 ml del medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Serendipia). La suspensión celular se transfirió a una placa de Petri y se mantuvo en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), 2,5 mM de L-glutamina (GIBCO), 100 U/mL de estreptomycin (Laboratorio Klonal) y 100 mg/mL de penicilina (Laboratorio Fabra). La incubación se realizó a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 . El medio de cultivo se cambió cada 48 h y las células se repicaron cuando alcanzaron confluencia del 80-90%, utilizando tripsina al 0,25% (GIBCO).

Para preparar el inóculo, las células se lavaron con 5 ml de buffer fosfato salino (PBS 1x) y se añadieron 3 ml de tripsina al 0,25% (GIBCO) agitando suavemente hasta el despegue completo. Se utilizó azul tripán al 0,4% (Sigma) que se mezcló en proporción 1:1 con la suspensión celular para evaluar su viabilidad. La solución resultante se colocó en una cámara de Neubauer, y las células viables y no viables fueron contabilizadas en un microscopio óptico (Nikon-TMS-F). Las células viables, al tener la membrana celular intacta no absorben el colorante. Sin embargo, las células no viables lo absorben y se tiñen de azul. La densidad celular se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Células / ml} = \frac{\text{Número de células viables} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4}{\text{número de cuadrantes contados}}$$

Luego se realizaron los cálculos y las diluciones necesarias para obtener una suspensión celular conteniendo 500.000 células CT26 por cada 100 μl de buffer PBS 1x. La suspensión

celular se mantuvo temporariamente en hielo hasta el momento de la administración a los animales.

3.5 Esquemas de administración de fármacos y células tumorales

Se detallan a continuación los esquemas de administración de compuestos y células a ratas y ratones, según corresponda.

En **ratas**:

- El **oxaliplatino** se administró en 3 aplicaciones de 4 mg/kg/día cada una, realizadas en días alternados por vía intraperitoneal (ip) (Fig. 9), alcanzando una dosis acumulada de 12 mg/kg (Kalemci et al., 2019b). Los animales controles recibieron vehículo, en este caso SF, también por vía i.p. El día de la primera inyección del quimioterápico se definió como el día 0 del esquema experimental.
- El **resveratrol** se administró por vía oral (*ad libitum*) (Bhatt et al., 2011). Se midió el volumen de bebida consumido por cada animal por día y se calculó la dosis promedio de resveratrol ingerida, siendo esta de 10 ± 3 mg/kg/día. En el agua de bebida de los animales de los grupos control y oxaliplatino se incorporó un volumen equivalente de etanol al 100%. Se diseñaron dos esquemas de administración del polifenol:
 - En el **esquema** denominado **preventivo (RESVp)** (Fig. 9A), la administración comenzó 4 días antes de la primera inyección de oxaliplatino (día -4 del esquema experimental) y se mantuvo en forma diaria hasta la eutanasia de los animales, realizada en forma alternativa los días 10 o 21 del esquema experimental (protocolos de corto y largo plazo respectivamente).
 - En el **esquema** denominado **terapéutico (RESVt)** (Fig. 9B), la administración de resveratrol comenzó 7 días después de la primera inyección del quimioterápico (día 7 del esquema experimental) y se mantuvo hasta la eutanasia de los animales, que se realizó el día 21 del esquema experimental (protocolo de largo plazo).

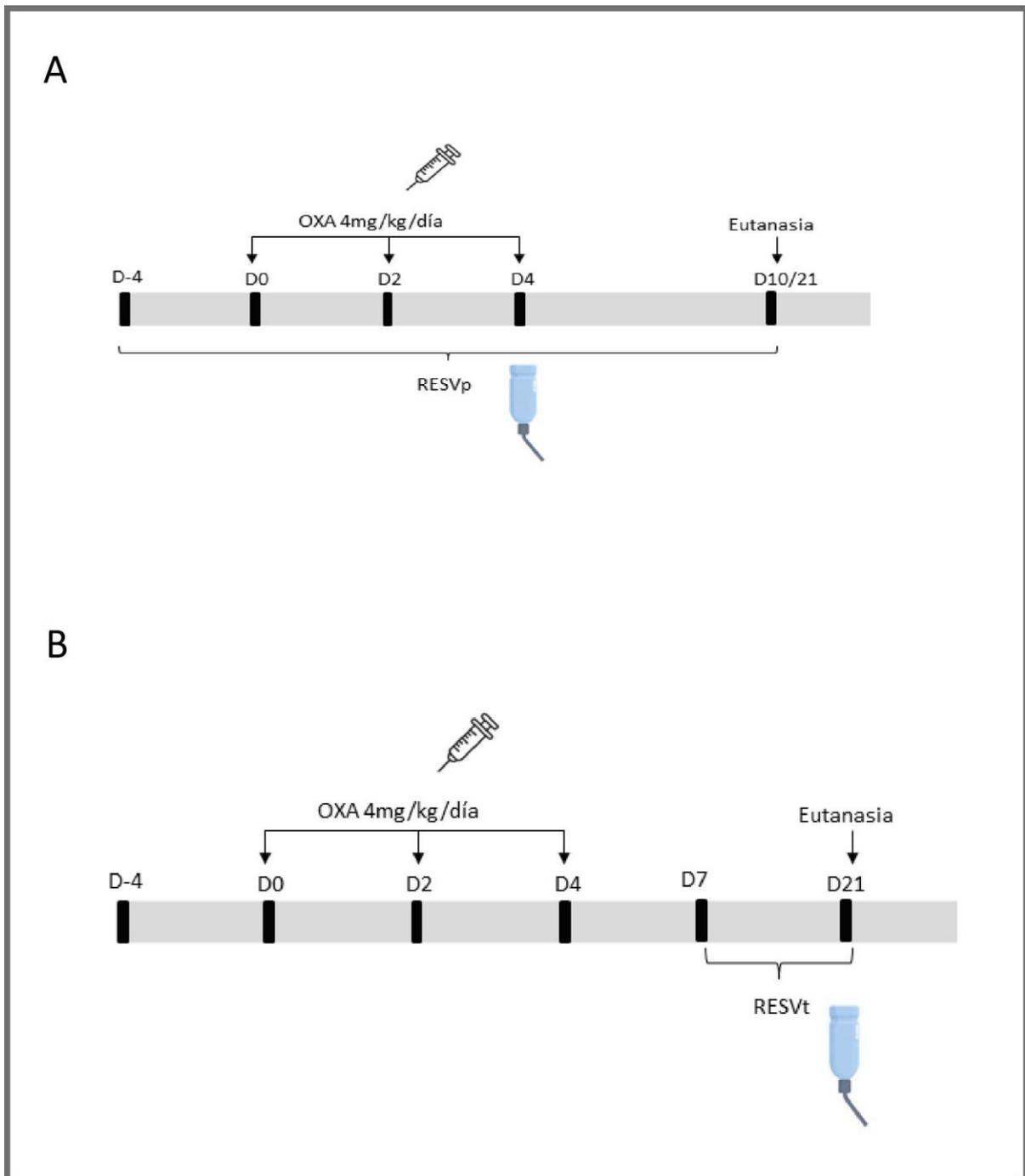


Figura 9. Esquema que muestra la secuencia temporal de administración de oxaliplatino y resveratrol a ratas. Este mismo cronograma de administración de oxaliplatino se aplicó a los animales que recibieron únicamente el quimioterápico. Como se indica, el resveratrol se administró bajo dos modalidades: de forma preventiva (A), es decir, antes, durante y después de la exposición al oxaliplatino en esquemas de corto o largo plazo, o de forma terapéutica (B), es decir, comenzando tras la finalización de la administración del quimioterápico y durante todo el período experimental, en protocolos de largo plazo.

En ratones:

- Para la inducción del tumor, se inyectaron 500.000 **células CT26**, resuspendidas en 100 μ l de SF, a cada animal (Fig. 10). La inyección se realizó por vía subcutánea en el flanco, según el procedimiento descrito por Malvicini y cols (Malvicini et al., 2009).
- El tratamiento con **oxaliplatino** comenzó una vez que los tumores alcanzaron un diámetro de 80-100 mm^3 , aproximadamente 10 días luego de la inoculación de las células. Se realizaron 3 inyecciones de 8 mg/kg de oxaliplatino en días alternados (Fig. 10), lo que resultó en una dosis acumulada de 24 mg/kg. El día de la primera inyección del quimioterápico se definió como el día 0 del esquema experimental.
- El **resveratrol** se administró por vía oral (*ad libitum*). Teniendo en cuenta el volumen de bebida consumido por cada animal por día, se calculó una dosis promedio de 20 ± 4 mg/kg/día. En el agua de bebida de los animales de los grupos control y oxaliplatino se incorporó un volumen equivalente de vehículo. Se utilizó un esquema preventivo, en el que la administración de resveratrol comenzó 1 día antes de la primera inyección de oxaliplatino, es decir el día -1 del esquema experimental, y se mantuvo hasta la eutanasia de los animales (Fig. 10).

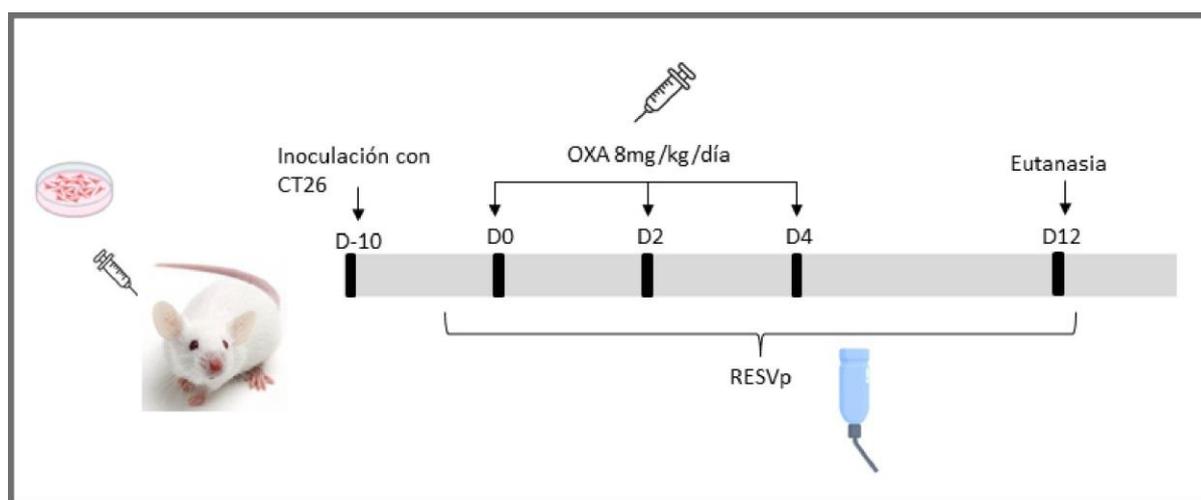


Figura 10. Esquema que ilustra las distintas etapas experimentales en ratones: la inducción del tumor mediante la inoculación subcutánea de células CT26 y la administración de oxaliplatino y resveratrol.

3.6 Evaluación del volumen tumoral en ratones

Luego de inyectadas las células, una vez que el tumor resultó palpable, se midió diariamente su volumen utilizando un calibre digital (Malvicini et al., 2009). Las mediciones se llevaron a cabo manipulando cuidadosamente los animales para minimizar el estrés. Se registraron las dimensiones correspondientes al diámetro mayor (D) y al diámetro menor (d), expresadas en milímetros. El volumen tumoral se calculó aplicando la fórmula $V = D \cdot (d)^2 \cdot \pi / 6$ (Malvicini et al., 2009). Los resultados se expresaron como volumen tumoral promedio (mm^3) para cada grupo experimental.

3.7 Estudios conductuales en ratas

Los estudios conductuales se realizaron en forma periódica a lo largo de todo el protocolo experimental, comenzando antes de la primera administración del quimioterápico para obtener valores basales, y continuando durante y después del período de administración del mismo. Los tiempos experimentales se detallan en los esquemas presentados a continuación en esta misma sección (ver Figs. 11, 12 y 13). Algunas cohortes de animales se evaluaron hasta el día 10 del período experimental (protocolos de corto plazo), mientras que otras se evaluaron hasta el día 21 o 28 (protocolos de largo plazo). En los **protocolos de corto plazo** se realizaron estudios conductuales y luego, el día 10, se disecaron los tejidos de interés para llevar a cabo estudios moleculares, bioquímicos e inmunohistoquímicos. En los **protocolos de largo plazo** se realizaron evaluaciones conductuales únicamente. En todos los estudios comportamentales se evaluó un mínimo de 12 animales por cada grupo experimental.

3.7.1 Medición del peso y del consumo de alimento

Los animales fueron pesados al menos 2 veces por semana, desde la fecha de su llegada al bioterio hasta su eutanasia de modo de registrar las variaciones del peso en función del tiempo, tanto en los protocolos de corto como de largo plazo (Fig. 11). Para cada uno de los grupos experimentales los resultados se expresaron como peso corporal promedio (g) y/o como porcentaje de incremento en relación al peso inicial (%).

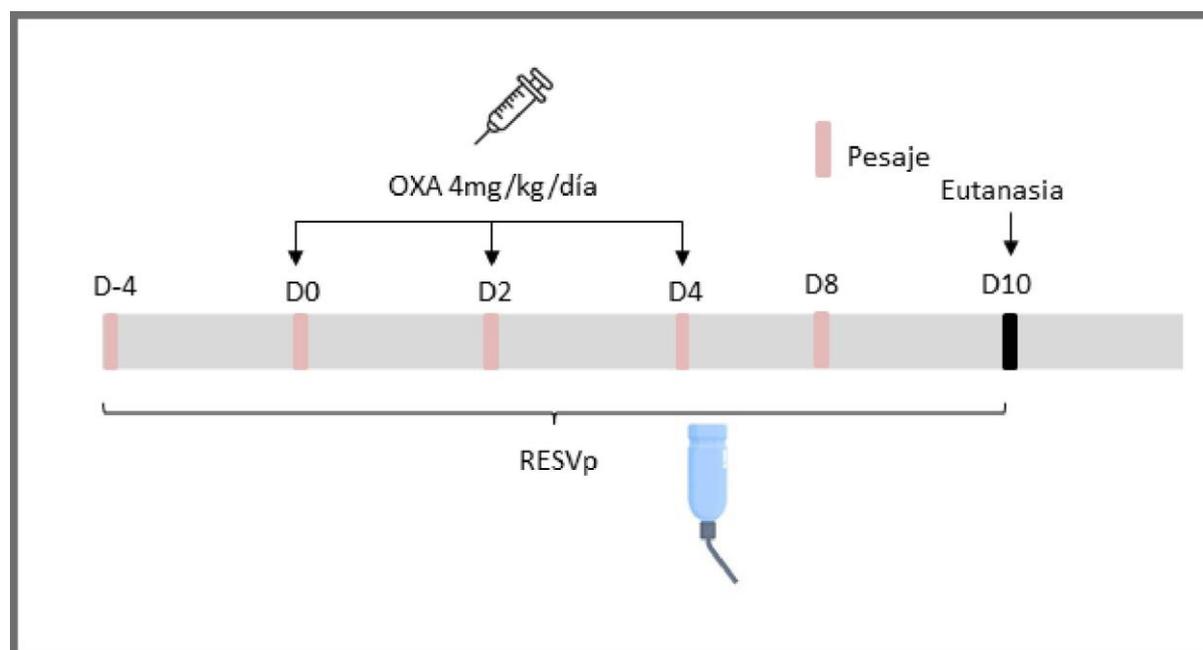


Figura 11. Esquema que muestra los días experimentales en los que se evaluó el peso corporal en los protocolos de corto plazo: antes, durante y después de la administración de oxaliplatino. Estas evaluaciones periódicas se mantuvieron hasta el día 21/28 en los protocolos de largo plazo. Este mismo esquema de trabajo se utilizó en animales que recibieron oxaliplatino y en aquellos que recibieron oxaliplatino y resveratrol preventivo.

También se evaluó el consumo de alimento a lo largo de tres períodos experimentales clave: antes del inicio del esquema de quimioterapia, durante el tratamiento, y tras su finalización. Este análisis permitió monitorear posibles alteraciones en el comportamiento alimenticio inducidas por el quimioterápico o por otras variables experimentales. El procedimiento consistió en proporcionar una cantidad inicial estándar de 400 g de alimento balanceado por jaula, a todos los grupos experimentales. A las 24 h, se realizó una medición precisa del peso de los pellets de alimento remanentes en cada jaula. La diferencia entre el peso inicial y el peso final permitió calcular el consumo diario de alimento por jaula (g). Para normalizar el consumo de alimento, los animales fueron pesados periódicamente, y se calculó el peso total de los animales en cada jaula (g). Posteriormente, el consumo de alimento en un cierto período se dividió por el peso total de animales de dicha jaula, obteniendo así un valor relativo que refleja la cantidad de alimento consumida por unidad de peso corporal por jaula (g/g).

3.7.2 Evaluación de indicadores de dolor espontáneo

Diariamente, se observó a los animales para registrar la presencia de indicadores de dolor espontáneo, tales como la adopción de posturas antálgicas (cambios posturales, conductas de protección de los miembros afectados), la falta de limpieza del pelaje o la aparición de placas alopécicas, que podría indicar acicalado deficiente o excesivo (Mogil, 2009).

3.7.3 Evaluación de alodinia mecánica: prueba de von Frey

Para evaluar el desarrollo de alodinia mecánica, los animales se colocaron en domos de acrílico situados sobre una malla de acero inoxidable (Casadei et al., 2022; Coronel et al., 2011, 2014). Los testeos se realizaron en forma periódica antes, durante y después del período de administración del quimioterápico, tanto en los protocolos de corto como de largo plazo, como se muestra en el siguiente esquema experimental (ver Fig. 12).

En cada sesión, los animales se aclimataron al entorno experimental durante 15 min (Coronel et al., 2017). La sensibilidad mecánica se evaluó mediante la estimulación de las patas traseras con estímulos mecánicos inocuos, utilizando una serie de ocho filamentos de von Frey calibrados para ejercer una fuerza constante de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 o 26 g (Stoelting) (Coronel et al., 2016). La estimulación se realizó siguiendo el método de “up-and-down” descrito por Dixon (Dixon, 1980) y Chaplan (Chaplan et al., 1994). En cada evaluación se inició con el filamento intermedio de 6 g. Si el animal no respondía, se aplicaba el siguiente filamento de mayor fuerza (8 g). Si en cambio, el animal respondía positivamente, se utilizaba el siguiente filamento de menor fuerza (4 g). Se consideró una respuesta positiva si el animal retiraba bruscamente su pata, la sacudía y/o lamía activamente.

Este procedimiento se repitió hasta obtener el número de respuestas requeridas (Casadei et al., 2022). Dado que el cálculo óptimo del umbral requiere 6 respuestas en las inmediaciones del umbral del 50% (Chaplan et al., 1994; Deuis et al., 2017), las estimulaciones se continuaron hasta registrar cinco respuestas adicionales después del primer cambio de respuesta de negativa a positiva.

En los casos en los que se observaron respuestas continuas, ya sea positivas (por ejemplo, en la secuencia 6+, 4+, 2+, 1+) o negativas (por ejemplo, en la secuencia 6-, 8-, 10-, 15-, 26-), se asignaron los correspondientes valores extremos, 1 g o 26 g, respectivamente. En todos los demás casos, el umbral de retirada del 50% (g) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{umbral del 50\%} = (10Xf + \kappa\delta) / 10000$$

Donde Xf es el valor (en unidades logarítmicas) del último filamento utilizado, κ es un valor tabular para el patrón de 6 respuestas positivas/negativas y δ es el incremento promedio (en unidades logarítmicas) entre filamentos (Chaplan et al., 1994; Deuis et al., 2017b; Dixon, 1980; Gao et al., 2007). Se definió la presencia de alodinia mecánica cuando el umbral de retirada fue de 6 g o menos (Coronel, et al., 2016).

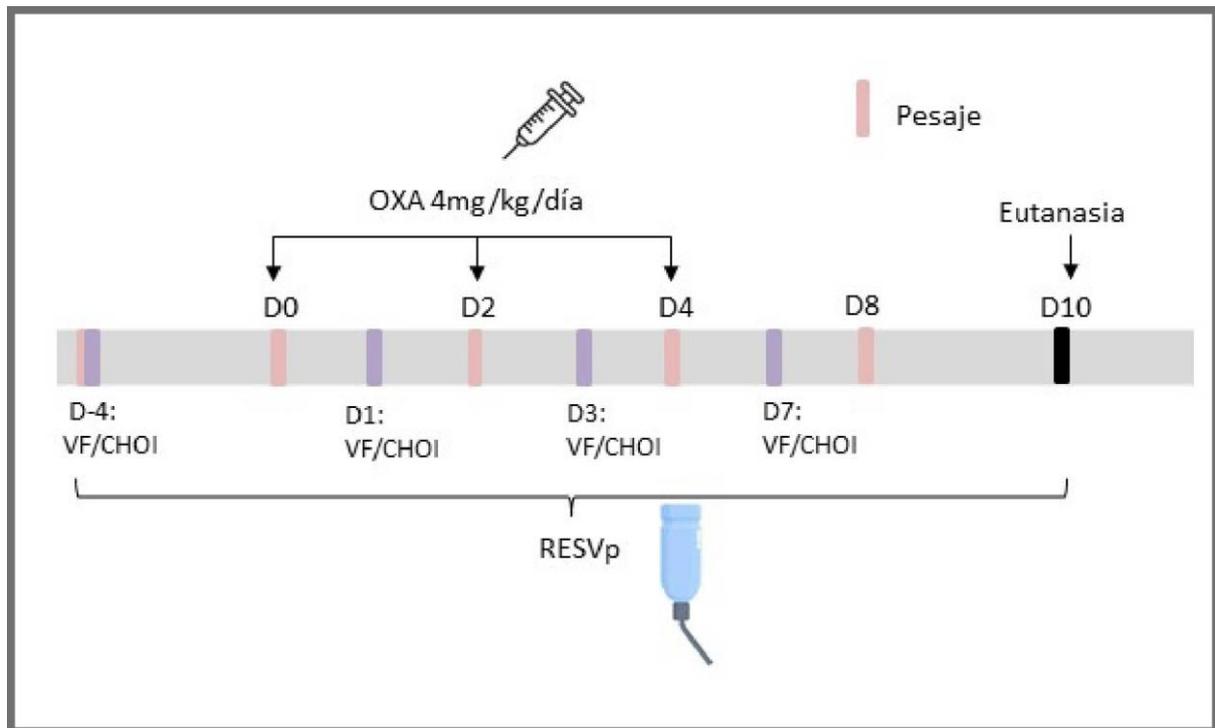


Figura 12. Esquema temporal en el que se indican los días en los que se llevaron a cabo los tests de von Frey y Choi en los protocolos de corto plazo: antes, durante y después del período de administración de oxaliplatino. Este mismo esquema de trabajo se aplicó tanto a animales que sólo recibieron oxaliplatino como a aquellos que recibieron oxaliplatino y resveratrol, ya sea en esquema preventivo (como se muestra en la figura) o terapéutico. En forma similar, estas evaluaciones periódicas se mantuvieron hasta el día 21/28 en los protocolos de largo plazo.

3.7.4 Evaluación de alodinia térmica fría: prueba de Choi

Después de finalizar el test de von Frey, se evaluó el desarrollo de la alodinia térmica fría utilizando el test de Choi (Casadei et al., 2022). Este ensayo se llevó a cabo en forma periódica antes, durante y después del período de administración del quimioterápico, tanto en los protocolos de corto como de largo plazo, según se muestra en la Figura 12.

La sensibilidad al frío se evaluó mediante la aplicación de una gota de 100 µl de acetona sobre la superficie plantar de las patas traseras, utilizando una jeringa de 1 ml. Para este procedimiento, los animales se colocaron en los domos de acrílico previamente descriptos. La estimulación con acetona se repitió 5 veces en cada pata, con un intervalo de 5 min entre cada aplicación para permitir que la temperatura de la pata regresara a su nivel basal (Coronel, et al., 2016). Tras cada estimulación, se observó a los animales durante 1 min y se registraron las respuestas positivas como la retirada o sacudida brusca, la lamida o cualquier intento de escapar del cubículo. Para cada estimulación con acetona la respuesta se clasificó como negativa (0) o positiva (1). La sensibilidad al frío se cuantificó como el número de respuestas positivas en un total de cinco estimulaciones, resultando en puntuaciones posibles de 0, 1, 2, 3, 4, o 5 (Coronel et al., 2016). Este enfoque corresponde al llamado “Choi tradicional” (Coronel et al., 2011, 2014; Coronel, et al., 2016).

Dado que al incluir hembras en el esquema experimental detectamos que estas respondían de manera más intensa a la estimulación con acetona (mayor número de retiradas bruscas o retiradas acompañadas de sacudidas y lamidas frente a una única estimulación), introdujimos cambios en la evaluación de las respuestas a fin de poder cuantificarlas. En el “Choi modificado”, se contabilizó el total de respuestas positivas del animal durante el minuto posterior a cada estimulación. Por ejemplo, si el animal retiraba bruscamente la pata y luego la sacudía dos veces, la puntuación asignada era de 3. En este formato, la puntuación mínima seguía siendo 0, pero no existía un límite máximo para las respuestas positivas.

3.7.5 Medición de parámetros de locomoción: prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto es una herramienta comúnmente utilizada para evaluar parámetros asociados a actividad locomotora y comportamiento exploratorio, en condiciones controladas (Gould et al., 2009). En esencia, el campo abierto consiste en un recinto, que puede tener forma cuadrada, rectangular o circular, con paredes elevadas que delimitan la deambulación de los animales, a los que se los deja circular libremente. El recinto utilizado para esta prueba consistió en área de 66 × 70 cm, delimitada por paredes de 43 cm de altura. La prueba se realizó en forma periódica, tanto antes como durante y después del período de administración del quimioterápico (Fig. 13).

Antes de cada sesión, los animales fueron habituados a la sala durante un período de 1 h, permitiendo la aclimatación al entorno y reduciendo posibles respuestas de estrés relacionadas con el nuevo contexto. Tras el período de habituación, se colocó a cada animal en un espacio delimitado en el centro del campo abierto y su comportamiento fue evaluado durante un período de 1 min. Durante este tiempo, el operador no permaneció en la sala, garantizando la ausencia de estímulos externos que pudieran influir en el comportamiento del animal. Para evitar interferencias debidas a señales olfativas, entre un animal y el siguiente el área del campo abierto se limpió utilizando papel humedecido con etanol al 10%.

La actividad se registró con una cámara de video de alta resolución, montada de manera fija para capturar el plano completo del campo abierto. Los registros se almacenaron para su análisis posterior que se llevó a cabo utilizando el *software* ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), complementado con el plugin Animal Tracker (Gulyás et al., 2016; Zhang et al., 2020),

permitiendo calcular métricas como la distancia total recorrida (cm), la velocidad promedio (cm/seg), y el tiempo que los animales permanecieron inmóviles (seg).

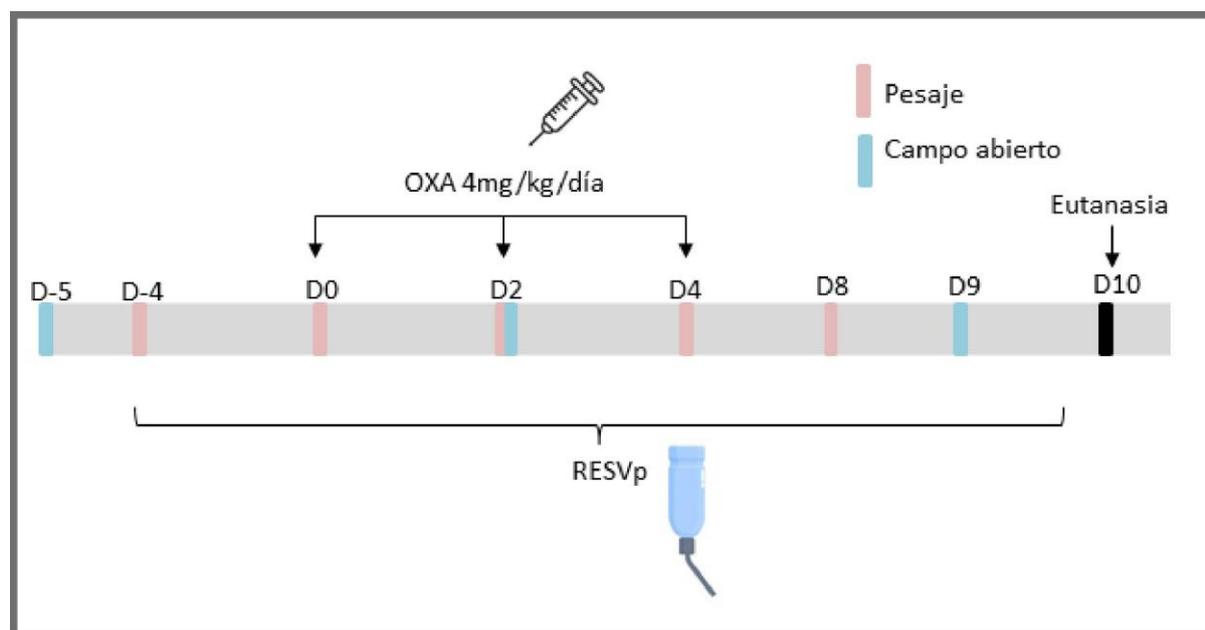


Figura 13. Esquema temporal que muestra los días en que se realizó la prueba de campo abierto, antes, durante y después del período de administración de oxaliplatino. Este mismo esquema se aplicó tanto a los animales que recibieron únicamente oxaliplatino como a aquellos que recibieron oxaliplatino y resveratrol en esquema preventivo.

3.8 Eutanasia y toma de muestras

Los animales incluidos en los protocolos de corto plazo se sometieron a eutanasia 10 días después de la primera inyección de oxaliplatino mediante anestesiada por inhalación de isoflorano (Piramal critical care) y posterior decapitación con guillotina. A continuación, utilizando material de cirugía estéril se realizó una laminectomía dorsal, con remoción de los arcos vertebrales dorsales, para exponer la médula espinal. Siguiendo referencias anatómicas y utilizando instrumental quirúrgico específico, se disecaron cuidadosamente los ganglios raquídeos lumbares (L4-6) bilaterales y los correspondientes segmentos de la médula espinal (Coronel et al., 2011, 2014). Además, se realizaron incisiones laterales en la piel a la altura de la cadera para acceder al nervio ciático bilateral. La musculatura circundante fue separada con pinzas finas y tijeras a fin de exponer el nervio, que fue aislado y disecado desde su emergencia en la región lumbar hasta su bifurcación en el muslo distal (Leiguarda et al., 2021). Por último, se recolectaron muestras de piel plantar de ambas patas traseras utilizando un punch pediátrico de 3 mm de diámetro. En todos los casos los tejidos se disecaron en frío y se colocaron en tubos estériles debidamente rotulados. Los tejidos destinados a evaluación mediante kits colorimétricos o ELISA fueron procesados en el momento, mientras que los tejidos destinados a estudios moleculares se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento (ver sección 3.9).

Para la obtención de tejidos fijados para estudios de inmunofluorescencia se procedió a realizar la perfusión transcardíaca de los animales, previa sobreenestesia con isoflorano (vía

inhalatoria) e hidrato de cloral (Biopack, 300 mg/kg, vía i.p.) (Coronel et al., 2008). El proceso de perfusión consistió en hacer circular, a través de la aorta ascendente, una solución de lavado (SF, pH=7.4) para desplazar la sangre del sistema circulatorio y los tejidos, y luego una solución fijadora conteniendo paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma). Se infundieron 60 ml de ambas soluciones, a una velocidad constante mediante la utilización de una bomba de perfusión (Coronel et al., 2008). Siguiendo los mismos abordajes descritos en la sección anterior, se disecaron los tejidos de interés, en particular los ganglios raquídeos lumbares L4-L5 y la médula espinal lumbar, asegurándose de preservar su integridad estructural para posteriores análisis. En este caso, los tejidos se colocaron en tubos conteniendo solución fijadora (PFA al 4%), en la que se mantuvieron durante 1 h a 4°C, seguido por inmersión en solución de sacarosa al 10% (Biopack) durante 24 hs, e inmersión en solución de sacarosa al 20% durante 5 hs, siempre a 4°C. Por último, los tejidos fueron inmersos en solución conteniendo una mezcla 50/50 de sacarosa al 20% y medio de montaje OCT Cryoplast (Biopack) y se almacenaron a 4°C hasta el armado de tacos (ver sección 3.9.7).

3.9 Estudios bioquímicos, moleculares y de inmunomarcación

3.9.1 Determinación de glutatión utilizando un método espectrofotométrico

Los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión total (GSht) se determinaron utilizando un kit colorimétrico (GSH+GSSG / GSht Colorimetric Assay Kit, Abcam ab239709) (Zhou et al., 2022). La prueba utilizada se basa en el uso del sistema de reciclaje de glutatión mediante el reactivo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y la enzima glutatión reductasa. En medio acuoso, DTNB reacciona con el GSH presente en la muestra para generar glutatión oxidado (GSSG) y ácido 2-nitro-5-tiobenzoico, que tiene un color amarillo, y cuya concentración puede determinarse a partir de la absorbancia a 412 nm. El GSSG generado es reducido a GSH por acción de la enzima glutatión reductasa, y este último reacciona nuevamente con DTNB para producir más ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. Por lo tanto, este sistema de reciclaje mejora significativamente la sensibilidad de la reacción (Rahman et al., 2007).

Se midieron los niveles de glutatión en el nervio ciático y en los ganglios raquídeos lumbares L4-L6. Cada grupo experimental incluyó al menos 6 animales, y se procesaron de manera conjunta tanto los nervios bilaterales como los ganglios bilaterales; así, cada muestra incluyó 2 nervios o 6 ganglios obtenidos del mismo animal. Los tejidos se cortaron en pequeños trozos utilizando tijeras de disección y luego se homogeneizaron en 0,4 ml de buffer glutatión (incluido en el kit) a 4°C, utilizando un homogeneizador portátil (2000-3000 rpm, DWK LIFE SCIENCES). Luego, se añadieron 100 µl de ácido sulfosalicílico (SSA) al 5% y se centrifugó a 8000 g por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se procedió a realizar el ensayo.

En paralelo se prepararon las soluciones estándar, añadiendo 50, 40, 30, 20, 10 o 0 µl de solución conteniendo 1 µg/µl de GSH en cada tubo debidamente rotulado. Luego, se añadió SSA al 1% en cantidad suficiente para alcanzar un volumen final de 100 µl por tubo.

Siguiendo el protocolo provisto por el fabricante del kit, se añadieron 160 µl de una solución conteniendo NADPH, glutatión reductasa y buffer de reacción a cada pocillo en una placa de

96 pocillos. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min, de modo de permitir la generación de NADPH. Luego, se agregaron 20 µl de cada una de las soluciones estándar de GSH y cada una de las muestras (en ambos casos por duplicado) y la placa se incubó a temperatura ambiente por 5-10 min. Por último, se añadieron 20 µl de la solución de sustrato a todos los pocillos, se incubó a temperatura ambiente por 5-10 min y se leyó la absorbancia a 412 nm utilizando un lector de placas (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation). Los niveles de GSht y GSH en cada una de las muestras fueron calculados mediante la curva estándar y expresados en nmol/mg proteína. Para ello, se determinó la concentración de proteínas en cada muestra midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro nanodrop (NanoDrop™ OneMicrovolume, Thermo-Fisher). Por último, se calcularon los niveles de GSSG ($GSSG = (GSht - GSH)/2$) y la relación GSH/GSSG.

3.9.2 Estudio de marcadores de peroxidación lipídica por espectrofotometría

Los niveles de malondialdehído (MDA), producto natural de la peroxidación lipídica, son utilizados como un indicador de este proceso oxidativo en células y tejidos. En un medio ácido y a altas temperaturas, el MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (de ahí que se lo denomine sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico o TBARS, por sus siglas en inglés), generando un producto cromogénico cuya concentración puede determinarse midiendo la absorbancia de la solución a 530 nm (Janero, 1990).

Se midieron los niveles de TBARS en el nervio ciático. Cada grupo experimental incluyó al menos 6 animales y se procesaron de manera conjunta los nervios bilaterales. De este modo, cada muestra incluyó 2 nervios obtenidos del mismo animal. Los nervios se colocaron en tubos conteniendo SF a 4°C durante 2 hs hasta su procesamiento. Luego, se cortaron en pequeños trozos con tijeras de disección y se homogeneizaron en buffer RIPA conteniendo Tris-HCl 50 mM, cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, Tergitol (NP-40) al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% (todos los reactivos fueron provistos como parte del kit) utilizando un homogeneizador portátil (2000-3000 rpm, DWK LIFE SCIENCES). Los homogenatos se centrifugaron a 1600 g por 10 min. En el sobrenadante se midieron los niveles de MDA utilizando un kit comercial (TBARS TCA Method, Cayman Chemicals 700870) (Smeriglio et al., 2023).

En primer lugar, se preparó una solución madre de MDA 125 µM y se realizaron 7 diluciones de modo de generar soluciones estándar con concentraciones decrecientes de MDA (B-H) y una solución blanco (A), como se indica en la tabla 1.

Luego se colocaron 100 µl de cada una de las muestras o de las soluciones estándar en viales debidamente rotulados. Se añadieron 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) y 800 µl de ácido tiobarbitúrico y se incubaron a 100°C por 60 min. Luego de la incubación, los viales se colocaron en hielo durante 10 min para frenar la reacción y posteriormente, se centrifugaron a 1600 g durante 10 min y a 4°C. Se removió cuidadosamente la capa orgánica y se transfirió a una placa de 96 pocillos.

Tube	MDA (μ l)	Water (μ l)	MDA Concentration (μ M)
A	0	1,000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

Tabla 1. Concentración de las soluciones estándar de MDA, según protocolo de Cayman Chemicals.

Finalmente, se midió la absorbancia a 530 nm usando un lector multiplaca (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation). Los niveles de TBARS se calcularon a partir de la curva standard y se expresaron en pmol/mg proteínas. Para ello, la concentración de proteínas se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro nanodrop (NanoDrop™ OneMicrovolume, Thermo-Fisher).

3.9.3 Evaluación de niveles de expresión génica mediante RT-qPCR

Los estudios moleculares se llevaron a cabo en muestras de ganglios raquídeos lumbares (L4-6) y médula espinal lumbar (L4-6). Cada grupo experimental incluyó al menos 8 muestras. Cada médula se procesó en forma individual mientras que los ganglios bilaterales obtenidos a partir de 2 animales se procesaron de manera conjunta, de modo que cada muestra de contenía un pool de 12 ganglios.

Para la extracción de ácido ribonucleico (ARN) se utilizó el siguiente protocolo. El día 1 se homogeneizaron las muestras utilizando Trizol (Invitrogen) y un homogeneizador manual (2000-3000 rpm, DWK LIFE SCIENCES). Se trabajó en flujo laminar manteniendo las muestras congeladas en hielo seco para evitar la acción de enzimas que degradan ARN (ARNasas) y una vez homogeneizadas se las colocó en viales a 4°C. Posteriormente, se las dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Mediante el agregado de cloroformo (Cicarelli), posterior incubación durante 5 min y centrifugación a 14.000 g por 15 min a 4°C se logró separar las fases orgánica y acuosa. Se recolectó la fase acuosa (superior) conteniendo el ARN. Luego se precipitó el ARN usando alcohol isopropílico (Biopack) y las muestras se guardaron en freezer a -30°C hasta el día siguiente (Coronel et al., 2016).

El día 2 se centrifugaron a 14.000 g por 10 min a 4°C para precipitar el ARN. Se descartó el isopropanol, se lavó el pellet con etanol al 70% y se procedió a centrifugar a 14.000 g por 10 min. Luego, se descartó el etanol, primero manualmente y luego mediante evaporación por incubación en un baño seco a 50°C por 5 min. Los pellets conteniendo ARN se resuspendieron en agua desionizada conteniendo di-etilpirocarbonato (H₂O-DEPC): 15 μ l en el caso de los ganglios y 40 μ l en el caso de las médulas. Posteriormente, se calentaron a 50°C por 5 min para asegurar su completa resuspensión (Coronel, et al., 2016). La concentración y pureza del ARN obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un

espectrofotómetro nanodrop (NanoDrop™ OneMicrovolume, Thermo-Fisher). Para cada muestra, la concentración de ARN se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que la densidad óptica a dicha longitud de onda equivale a 40 µg de ARN en 1 ml de solución, y utilizando la siguiente ecuación:

$$[ARN](\mu\text{g} / \mu\text{l}) = \frac{(\text{Absorb.}260\text{nm}) \times (40 \mu\text{g} / \text{ml})}{(1000 \mu\text{l} / \text{ml})}$$

Durante el día 3 se realizó la retro transcripción. En primer lugar, se realizaron diluciones de cada muestra de manera de partir de 2 µg de ARN en todos los casos. El ARN total fue tratado con la enzima desoxirribonucleasa (ADNasa, Promega) para remover la contaminación con ácido desoxirribonucleico (ADN), incubando las muestras a 37°C por 30 min. Luego se agregó EGTA (Promega) y se incubó a 65°C por 10 min para inactivar la ADNasa. A cada tubo se le agregó una mezcla de cebadores aleatorios (Random primers, Promega) y se incubó a 70°C por 5 min, para luego poder llevar a cabo la reacción de síntesis del ADN copia (cDNA) utilizando la Transcriptasa Inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MLVRT, Promega). Para ello, las muestras se incubaron con una mezcla de reacción conteniendo 200 unidades (U) de M-MLVRT, 40 U del inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, Promega), una solución de los 4 nucleótidos (dNTPs, Promega) en concentración 10 mM, H₂O-DEPC y buffer (Promega) durante 1 h a 37°C. Luego se frenó la reacción incubando las muestras a 70°C por 10 min, y se guardaron a -30°C hasta su posterior uso (Coronel, et al., 2016).

La expresión relativa de los ARNm de interés se determinó usando la química de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) y el termociclador AriaMx Real-time PCR System (Agilent) a través de la reacción de la polimerasa en cadena, en tiempo real (RT-qPCR). A fin de evaluar los niveles de expresión de los diferentes genes de interés se diseñaron cebadores específicos utilizando la herramienta *primer blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). En algunos casos, las secuencias de los cebadores fueron tomadas de publicaciones previas. En la tabla 2 se detallan los genes estudiados y las secuencias de los cebadores utilizados. Los cebadores para los que no figura una referencia bibliográfica diseñados en *primer blast*.

Para todos los pares de cebadores (sentido y antisentido) se realizaron las correspondientes curvas de rango dinámico a fin de definir las condiciones (temperatura y tiempo de apareamiento) óptimas de uso. La concentración de cebadores utilizada fue de 400 nM en todos los casos. Las curvas de calibración obtenidas fueron utilizadas para calcular la eficiencia de la reacción de amplificación, que fue de 2±0.1 en todos los casos.

Por su parte, las condiciones de ciclado fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg y 40 ciclos de apareamiento y extensión a la temperatura y el tiempo óptimos para cada par de cebadores, seguidos por la curva de disociación.

El gen GAPDH fue seleccionado como estándar interno o normalizador, dado que se expresa constitutivamente en los tejidos evaluados. Los cambios en los niveles de los ARNm de interés se calcularon usando el método matemático descrito por Pfaffl (Pfaffl 2001), se normalizaron en función de los niveles del estándar interno (GAPDH) en cada muestra y se expresaron como tasa de cambio (fold change), es decir, aumento o disminución en la expresión del gen de interés en relación al nivel de expresión en los animales controles (Coronel, et al., 2016).

Gen	Primer forward	Primer reverse	Citas bibliográficas
ATF3	CACCTTTGCCATCGGATGTCC	CTTTCCCGCCGCCTCCTT	(Jiang et al., 2010)
BDNF	CTGGGGGAGCAGGTGAGAAC	ACTGGAAGCCCAGAGAAGGC	
CB1	CTACTGGTGTGTGTGTCATC	GCTGTCTTTACGGTGAATAC	(Guindon et al., 2013)
CB2	GCAGCCTGCTGCTGACTGCTG	TGCTTTCCAGAGGACATACCC	(Guindon et al., 2013)
c-fos	AGCATGGGCTCCCTGTCA	GAGACCAGAGTGGGCTGCA	(Kawasaki et al., 2009)
GADPH	CGCATCTTCTGTGCAGT	AATGAAGGGGTCGTTGATGG	(Marsh et al., 2012)
GFAP	TGAGTCGTCGGAGGAGGAG	GCTGTGAGGTCTGGCTTGG	(Le Coz GM et al.,2014)
HMGB1	AGTTTCCTGAGCAATCCGTAT	TGTATCCCCAAAAGCGTGAG	
HO-1	CTTTCAGAAGGGTCAGGTGTC	TGCTTGTTTCGCTCTATCTCC	(Tamaki et al., 2014)
IBA-1	TCCCATCCAACCTCTCTTCC	GCAGCCTCATCGTCATCTC	
IL-1b	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	(Peinnequin A. et al.,2004)
IL-10	TGCCTTCAGTCAAGTGAAGAC	AAACTCATTGATGGCCTTGTA	
NGF	GGAGGTACTGGCCGCTCT	CCTGGTGCATTCTGCGTT	
NFkB	CACTCTCTTTTGGAGGT	TGGATATAAGGCTTTACG	(Tamaki et al., 2014)
NQO-1	CATCATTGGGCAAGTCC	ACAGCCGTGGCAGAACTA	(Tamaki et al., 2014)
NRF2	GCTATTTTCCATTCCCGAGTTAC	ATTGCTGTCCATCTCTGTGAG	(Tamaki et al., 2014)
SIRT1	GAAAATGCTGGCCTAATAGACTTG	TGGTACAAACAAGTATTGATTACCG	(Tamaki et al., 2014)
Sustancia P	TGGTCAGATCTCTCACAAAGG	TGCATTGCGCTTCTTTCATA	
TGFβ	AGATTCAAGTCAACTGTGGAG	AAGCCCTGTATTCCGCTCT	
TNFα	TCGTAGCAAACCAAGCA	CCCTGAAGAGAACCTGGGAGTA	(Jin et al., 2008)
TRPA1	AGTGGAATGTGGAGCGATA	TCCCGTCGATCTCAGCAATG	(Pohózczy et al., 2015)
TRPV1	GCGAGTTCAAAGACCCAGAG	GGCATTGACAACTGCTTCA	(Yang et al., 2006)
TRPM8	GCAGTGGTACATGAACGGAGT	TGAAGAGTGAAGCCGGAATAC	(Yang et al., 2006)

Tabla 2. Secuencias sentido y antisentido de los cebadores utilizados.

3.9.4 Determinación de los niveles del factor neurotrófico NGF mediante ELISA

Los niveles de NGF se evaluaron en muestras de piel de la superficie plantar de las patas traseras, en ganglios raquídeos lumbares y en médula espinal lumbar mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit comercial (MyBiosource,

MBS2701224) (Patterson et al., 2022). Cada grupo experimental incluyó al menos 6 animales. Cada médula se procesó en forma individual mientras que, tanto los nervios bilaterales como los ganglios bilaterales se procesaron de manera conjunta; así, cada muestra incluyó 2 nervios o 6 ganglios obtenidos del mismo animal. Para ello, los tejidos se lavaron con PBS 1x (pH=7,4) a 4°C a fin de remover el exceso de sangre, previo a la homogeneización. Luego se homogeneizaron en un buffer de lisis provisto en el kit comercial, utilizando un homogeneizador manual (2000-3000 rpm, DWK LIFE SCIENCES) y se centrifugaron durante 5 min a 10.000 g. Posteriormente, se separó el sobrenadante para realizar el ensayo, siguiendo las indicaciones provistas por el fabricante. En primer lugar, se prepararon diluciones de la solución estándar para la curva de calibración.

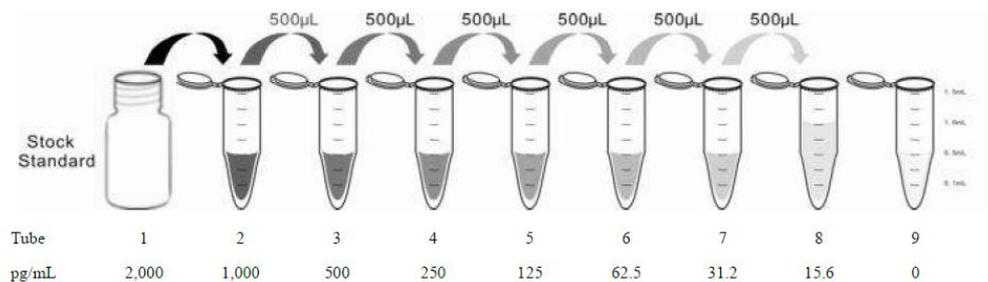


Figura 14. Preparación de diluciones de la solución estándar conteniendo concentraciones decrecientes de NGF. Imagen tomada del protocolo de MyBiosource.

Luego se añadieron 100 µl de cada una de las diluciones del estándar, el blanco y las muestras en los pocillos correspondientes. Se cubrió la placa con un film sellador y se incubó durante 1 h a 37°C. Se procedió a retirar el líquido por inversión, sin enjuagar. Luego, utilizando una pipeta multicanal, se añadieron 100 µl de la solución del reactivo A a cada pocillo y se incubó nuevamente durante 1 h a 37°C. Se descartó la solución por inversión y se realizaron 3 lavados con solución provista por el fabricante para tal fin. Posteriormente, se eliminó cualquier resto de solución invirtiendo la placa sobre papel absorbente, se añadieron 100 µl de solución del reactivo B y se incubó durante 30 min a 37°C.

Luego de realizar 5 lavados, se añadieron 90 µl de solución de sustrato, se selló la placa con un nuevo film sellador y se incubó durante 20 min a 37°C, protegiendo la placa de la luz. El agregado de este reactivo generó un cambio en la coloración de los pocillos, resultando en una tonalidad azul. Se incorporaron luego 50 µl de una solución de detención, resultando en un cambio de color a tonalidad amarilla. Inmediatamente se realizó la medición de la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation). En paralelo se determinó la concentración de proteínas en cada muestra, a través de la medición de la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro nanodrop (NanoDrop™ OneMicrovolume, Thermo-Fisher). La concentración de NGF en cada muestra se expresó como pg de NGF / mg de proteínas.

3.9.5 Determinación de los niveles de endocannabinoides mediante ELISA

Los niveles de los endocannabinoides AEA y 2AG se evaluaron en muestras de ganglios y médula lumbar mediante un ensayo de ELISA utilizando un kit comercial (rat 2AG ELISA Kit, MyBioSource MBS1600322; rat AEA ELISA Kit, MyBioSource MBS7254942). Cada grupo experimental incluyó al menos 6 animales. Cada médula se procesó en forma individual mientras que los ganglios bilaterales se procesaron de manera conjunta; así, cada muestra 6 ganglios obtenidos del mismo animal. Para ello, los tejidos se lavaron con PBS 1x (pH=7,4) a 4°C a fin de remover el exceso de sangre, previo a la homogeneización. Luego se homogeneizaron en PBS, utilizando un homogeneizador manual (2000-3000 rpm, DWK LIFE SCIENCES). Luego de un doble proceso de congelado – descongelado, se centrifugaron durante 10 min a 5.000 g y se separó el sobrenadante para realizar el ensayo, siguiendo las indicaciones provistas por el fabricante.

En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de la solución estándar para realizar la curva de calibración. Luego se añadieron 100 µl de cada una de las diluciones estándar, el blanco y las muestras en los pocillos correspondientes. A continuación, se añadieron 50 µl del anticuerpo conjugado a todos los wells, excepto el blanco. Se cubrió la placa con un film sellador y se incubó durante 1 h a 37°C. Se precedió a retirar el líquido por inversión, sin enjuagar. Luego, utilizando una pipeta multicanal, se añadieron 100 µl de la solución del reactivo A a cada pocillo y se incubó nuevamente durante 1 h a 37°C. Se descartó el líquido por inversión y se realizaron 5 lavados con la solución provista para tal fin. Se eliminó cualquier resto de solución invirtiendo la placa sobre papel absorbente, y se añadieron 50 µl del sustrato A y 50 µl del sustrato B a todos los pocillos. Se incubó durante 15 min a 37°C, en oscuridad. Luego de realizar 5 nuevos lavados, se añadieron 50 µl de la solución *Stop* e, inmediatamente, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation). En paralelo se determinó la concentración de proteínas en cada muestra, a través de la medición de la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro nanodrop (NanoDrop™ OneMicrovolume, Thermo-Fisher). Las concentraciones de AEA y 2AG en cada muestra se expresaron como ng de AEA/mg de proteínas y µg de 2AG/mg de proteínas, respectivamente.

3.9.6 Ensayos de inmunomarcación

Para el armado de los tacos, los ganglios raquídeos L4-6 bilaterales y la médula espinal lumbar se colocaron cuidadosamente sobre platinas plásticas y se embebieron en el medio de inclusión OCT Cryoplast (Biopack). Cada grupo experimental incluyó al menos 5 animales y cada taco incluyó ganglios o médulas de animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, a fin de facilitar la comparación de la señal inmunoreactiva. Los tacos se congelaron en nitrógeno líquido para preservar la morfología y las propiedades antigénicas de los tejidos y se almacenaron a -30°C, envueltos en papel metalizado para protegerlos de la desecación y la luz, debidamente rotulados.

Los tacos se cortaron en secciones de 14 µm utilizando un crióstato (HM525 NX, Thermo Fisher). Las secciones de médula espinal se realizaron transversalmente para garantizar la completa visualización del asta dorsal, mientras que las de los ganglios raquídeos se realizaron

longitudinalmente para maximizar la superficie de análisis. Las secciones obtenidas se montaron en portaobjetos gelatinizados para asegurar su adhesión. Los portaobjetos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

A fin de llevar a cabo el procedimiento para inmunomarcación, los portaobjetos se colocaron en cámara húmeda para evitar la desecación de los tejidos. Las secciones se lavaron 3 veces con buffer PBS 1X para eliminar restos de OCT y luego se incubaron durante 1 h con una solución de bloqueo conteniendo BSA (Sigma) al 10%, SFB (Natocor) al 5%, y Triton X-100 (Sigma) al 0,3% en PBS 1X. Después de descartar la solución de bloqueo, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una solución compuesta por BSA al 1%, SFB al 1% y Triton X-100 al 0,1% en PBS 1X. Esta incubación se realizó durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Al día siguiente, tras tres lavados de 5 min con PBS 1X, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, se incubaron con una solución del colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, TOCRIS, 1/1000 en PBS 1X) durante 30 min para marcar los núcleos celulares. Posteriormente, se realizaron dos lavados adicionales con PBS 1X y un último lavado con agua destilada. Para el montaje, se utilizó el medio DABCO (Sigma) al 2,5% en glicerol.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se encuentran detallados en la siguiente tabla:

Anticuerpo primario o secundario	Marca y número de catálogo	Dilución utilizada
GFAP (rabbit)	DAKO Z0334	1/500
IBA-1 (rabbit)	Sigma ZMS1024	1/200
Donkey anti rabbit- FITC	Jackson 711095003	1/200
Goat anti rabbit- FITC	Vector BA-1000	1/200

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia.

Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Eclipse Ni, H-600L, Intensilight CHGFIE, Nikon) con objetivos de magnificación de 10x y 20x. Para garantizar la comparabilidad de las imágenes entre las muestras, se mantuvieron constantes las condiciones de intensidad lumínica y tiempo de exposición durante todo el proceso de captura.

La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el *software* ImageJ mediante la herramienta ROI Manager. En el caso de los ganglios raquídeos, el análisis se llevó a cabo en imágenes tomadas con un aumento de 20x. Se distribuyeron 8 regiones de interés (ROIs) en de 527 x 573 μm distribuidas a lo largo del ganglio, priorizando las áreas que contenían cuerpos neuronales. Para cada ROI, el software calculó la intensidad media de fluorescencia y el área. Los datos obtenidos de los 8 ROIs por sección se promediaron para obtener un valor

representativo por ganglio. En el caso de la médula espinal, el análisis se realizó en imágenes capturadas con un aumento de 10x. Se posicionaron 6 ROIs de 902 x 560 μm , ubicadas en la región medial y lateral de cada una de las zonas de interés: 2 ROIs en lámina I-II, 2 ROIs en lámina III-IV, y 2 ROIs en lámina V-VI. Para cada ROI, se calcularon la intensidad media de fluorescencia y el área. Los datos obtenidos se promediaron primero por zona (2 ROIs) y luego por asta dorsal (6 ROIs).

3.10 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software). La distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM) y el análisis estadístico aplicado dependió de las características y el diseño experimental de cada conjunto de resultados:

- Peso corporal, umbral de retirada a estímulos mecánicos, número de respuestas a estímulos fríos: Estos datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas repetidas, seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, para evaluar las interacciones entre los factores experimentales y las variaciones en el tiempo.
- Consumo de alimento y parámetros asociados a locomoción: Los datos relacionados con el consumo de alimento y los parámetros de locomoción, como la distancia recorrida, la velocidad y el tiempo de inmovilidad, fueron evaluados mediante un ANOVA de dos vías para medidas repetidas o un ANOVA de una vía, según correspondiera, seguido del post-test de Bonferroni o Tukey para realizar comparaciones entre grupos.
- Estudios bioquímicos, moleculares y de inmunofluorescencia: Los datos derivados de estos estudios se analizaron utilizando el test de Student (para comparaciones entre dos grupos) o un ANOVA de una vía (para comparaciones entre más de dos grupos) seguido del post-test de Newman-Keuls para la identificación de diferencias significativas entre grupos específicos.

En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando p resultó inferior a 0.05. Las diferencias significativas entre grupos se representaron en los gráficos de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Estudios clínicos (Proyecto IV)

3.11 Evaluación por el Comité de Ética

El presente estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Evaluación (CIE) de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (CIE #016-23), así como por la Comisión Conjunta de Investigación en Salud de la Provincia de Buenos Aires (NO-2024-15921014-GDEBA-DPEGSFFMSALGP). Asimismo, el protocolo fue aprobado por la Dirección

Médica del Hospital Universitario Austral. El estudio se realizó en estricto cumplimiento de las normativas éticas nacionales e internacionales, incluyendo la Declaración de Helsinki, las Normas de Buenas Prácticas Clínicas y la legislación vigente en Argentina. Todos los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado correspondiente.

3.12 Diseño experimental y cohorte en estudio

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, utilizando una técnica de muestreo consecutivo de manera que todos los pacientes que cumplieron con los criterios de elegibilidad fueron incorporados al estudio. Se incluyeron 56 pacientes adultos con adenocarcinoma colorrectal que recibieron tratamiento con oxaliplatino en el Hospital Universitario Austral, centro de referencia de la Provincia de Buenos Aires, durante los años 2019 y 2021. Se excluyeron pacientes con enfermedades neurodegenerativas, trastornos neurológicos, cuadros de neuropatía y dolor crónico de etiología no relacionada a la quimioterapia, y aquellos pacientes de los que no se contaba con información completa.

Todos los pacientes incluidos en el estudio recibieron oxaliplatino en esquema FOLFOX oXELOX. El esquema FOLFOX consiste en una combinación de oxaliplatino, leucovorina (ácido folínico) y 5-fluorouracilo: oxaliplatino 85 mg/m² día 1 + leucovorina 200 mg/m² día 1 + fluorouracilo 400 mg/m² en bolo día 1 + fluorouracilo 2400 mg/m² en bomba de infusión continua por 48hs (André et al., 2004). Este esquema se repite cada 14 días. El esquema XELOX combina oxaliplatino con capecitabina, una pro-droga oral del 5-fluorouracilo: oxaliplatino 130 mg/m² día 1 + capecitabina 2000 mg/m² día 1 a 14 (Lieu et al., 2019). Este esquema se repite cada 21 días. Para ambos esquemas, por lo general se administran entre 4 y 12 ciclos de quimioterapia. El número total de ciclos depende de la decisión médica basada en la evaluación de la efectividad del tratamiento y la tolerancia del paciente.

3.13 Variables en estudio

Se realizó la revisión retrospectiva de las historias clínicas electrónicas y se registraron los datos de interés en una planilla de Excel. En particular, se registró la edad al momento del diagnóstico, el sexo, el índice de masa corporal (IMC, según definición de OMS), el rango de peso (sobrepeso: IMC>25; normopeso: 18,5-25; bajo peso: IMC<18,5), el estadio tumoral (I-IV), el esquema quimioterápico utilizado (FOLFOX o XELOX), la dosis de oxaliplatino administrada en cada ciclo (85 o 130 mg/m²), la dosis acumulada (mg/m²), el desarrollo de síntomas compatibles con NPIQ, el período de manifestación de los síntomas (sólo durante, sólo después, o tanto durante como después del tratamiento quimioterápico), y la necesidad de reducir la dosis / interrumpir el tratamiento quimioterápico.

El diagnóstico de la neuropatía inducida por oxaliplatino se basó en el reporte de síntomas asociados a este efecto adverso del tratamiento antitumoral como la presencia de parestesias, disestesias, dolor, calambres musculares, etc (Staff et al., 2019), y fue realizado por el oncólogo a cargo del seguimiento de cada paciente. Por su parte, las modificaciones de la dosis de oxaliplatino (reducción / interrupción del fármaco) se realizaron siguiendo protocolos vigentes (Lieu et al., 2019). De este modo, la dosis se redujo entre un 20% y 30%

en caso de parestesias persistentes entre ciclos, y se discontinuó el tratamiento si las parestesias se asociaban con deterioro funcional.

3.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando medidas descriptivas para resumir las características demográficas y clínicas de la población. Las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y porcentajes. Para evaluar las asociaciones entre variables categóricas se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, utilizando el *software* InfoStat, versión 2020. En particular, esta prueba se utilizó para analizar la asociación entre el desarrollo de NPIQ y variables como el sexo, la presencia de sobrepeso, el estadio tumoral, el esquema quimioterápico y el rango de dosis acumulada. También para analizar la asociación entre el sexo del paciente y las variables recién mencionadas, la necesidad de reducir / interrumpir el tratamiento quimioterápico y el período de manifestación clínica. En los casos donde no se cumplían los supuestos del Chi-cuadrado, se utilizó la prueba exacta de Fisher, empleando el *software* SPSS (IBM SPSS Statistics versión 29.0.2.0).

Para analizar la asociación de NPIQ con una variable numérica como la edad se utilizó la prueba exacta de Fisher, empleando el *software* SPSS. Finalmente, para comparar variables numéricas como el IMC entre hombres y mujeres se realizó la prueba t de Student utilizando GraphPad Prism versión 9.0.2. En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativas las asociaciones con un valor de p inferior a 0.05.

4. RESULTADOS

Proyecto I

4.1 Procesos neurotóxicos inducidos por oxaliplatino en estructuras clave de la neurotransmisión nociceptiva

En este proyecto se evaluaron los cambios desencadenados por la administración de oxaliplatino en las neuronas aferentes primarias, principales blancos de las acciones neurotóxicas del quimioterápico. Además, se investigó la existencia de efectos a nivel del asta dorsal de la médula espinal, estructura que recibe las aferencias periféricas y que tiene un rol crucial en la modulación del dolor. Los estudios se centraron en analizar procesos relacionados a estrés y daño oxidativo de macromoléculas, daño y activación neuronal, activación de células gliales y producción de mediadores proinflamatorios. Todos estos análisis se llevaron a cabo en tejidos (nervio ciático, ganglios raquídeos L4-6 y médula espinal lumbar) obtenidos a partir de ratas macho, que recibieron oxaliplatino o vehículo, y que fueron sometidas a eutanasia 10 días después de iniciado el esquema quimioterápico (protocolo de corto plazo), tal como se describe en la figura 10A de Materiales y Métodos.

4.1.1 Estrés y daño oxidativo

Dado que las acciones neurotóxicas del oxaliplatino habían sido previamente asociadas a daño mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y daño oxidativo de macromoléculas (Branca et al., 2021; Fumagalli et al., 2021; A. B. Wang et al., 2021; G. Wei et al., 2021), decidimos evaluar, en primer lugar, la presencia de marcadores de estrés y daño oxidativo en el nervio ciático y los ganglios raquídeos de los animales expuestos a oxaliplatino, a modo de validación del modelo experimental utilizado. En particular, estudiamos los niveles de glutatión total, una de las principales reservas tisulares con capacidad antioxidante, la relación glutatión reducido / glutatión oxidado, indicador del estado oxidativo, y los niveles de TBARS, indicadores generales de peroxidación lipídica. Estos estudios, llevados a cabo utilizando métodos espectrofotométricos y citometría de flujo, fueron realizados en homogenatos obtenidos a partir del nervio ciático o los ganglios raquídeos lumbares de animales controles y expuestos al quimioterápico.

La administración de oxaliplatino no alteró los niveles de glutatión total en el nervio ciático (Fig. 15A). No obstante, se observó una marcada disminución en la relación glutatión reducido/glutatión oxidado en comparación con los valores registrados en los animales del grupo control (Fig. 15B), lo que evidencia un estado de estrés oxidativo en el tejido 10 días después del inicio del ciclo de administración del quimioterápico. En línea con estos hallazgos, detectamos un aumento en los niveles de TBARS, tanto en el nervio ciático (Fig. 15C) como en los ganglios raquídeos lumbares (Fig. 15D) de los animales tratados con OXA.

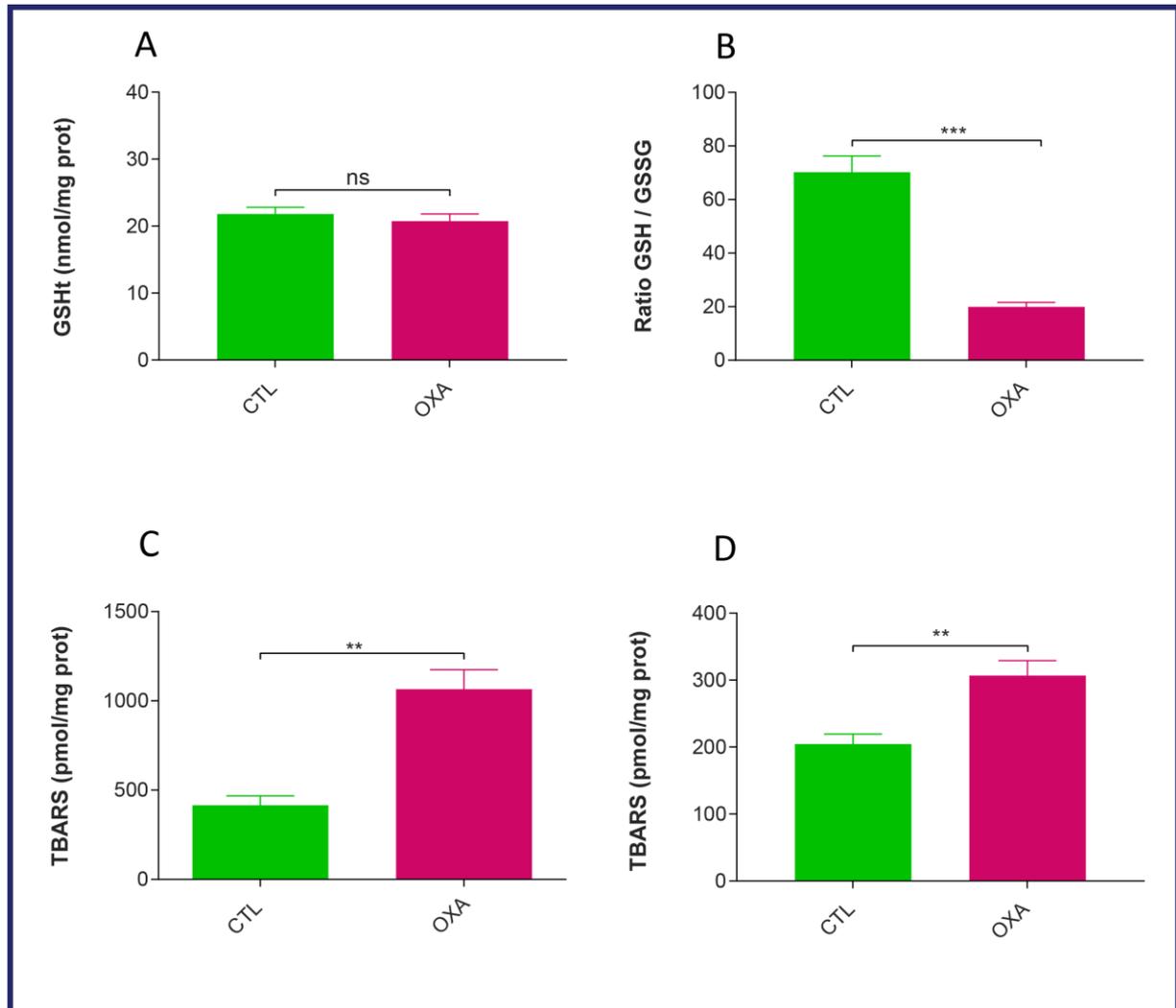


Figura 15. Niveles de glutatión total (A), relación glutatión reducido / glutatión oxidado (B), y niveles de TBARS (C) en el nervio ciático de animales que recibieron oxaliplatino. En (D) se muestran los niveles de TBARS en los ganglios anexos a la raíz dorsal L4-6. Todas las determinaciones fueron realizadas 10 días después del inicio del ciclo quimioterápico. Se incluyeron 6 muestras por grupo experimental. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron utilizando los siguientes símbolos: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.1.2 Daño y activación neuronal.

También evaluamos la expresión de una variedad de marcadores asociados a daño y activación neuronal, que además participan en la modulación de la neurotransmisión nociceptiva, en dos estructuras clave, los ganglios raquídeos y la médula espinal lumbar. Estos estudios fueron realizados aplicando metodologías de RT-PCR en tiempo real y ELISA en tejidos obtenidos 10 días después de iniciada la administración del quimioterápico.

En los ganglios observamos un incremento en la expresión del factor de transcripción ATF-3 (Fig. 16A), comúnmente relacionado a daño neuronal. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de los ARNm correspondientes a HMGB1, molécula asociada a daño (Fig. 16B), el proto-oncogen c-fos, utilizado como marcador de hiperexcitabilidad neuronal (Fig. 16C), o la sustancia P, neuropéptido involucrado en la neurotransmisión del dolor (Fig. 16D).

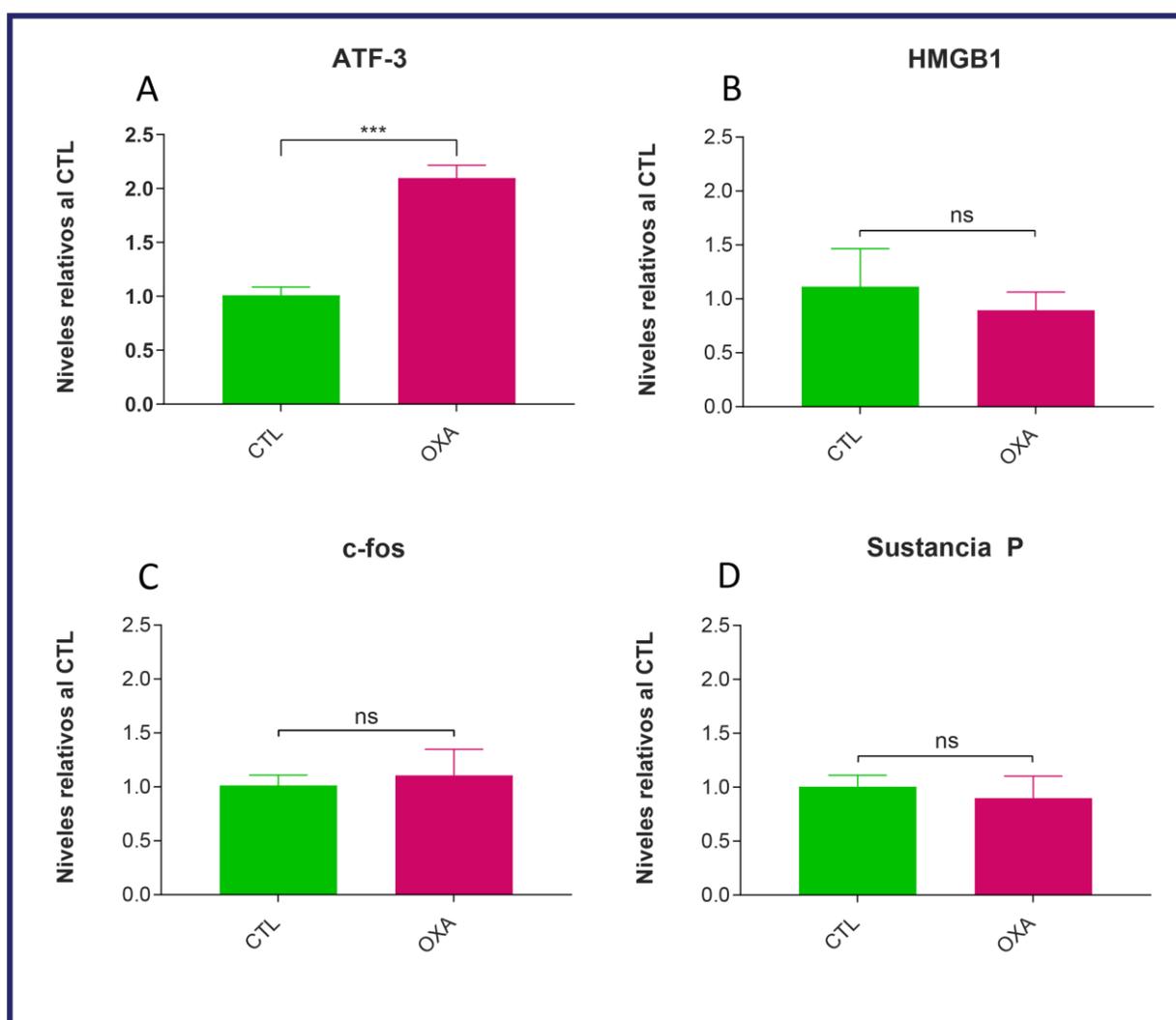


Figura 16. Niveles relativos al control de los ARNm correspondientes a ATF-3 (A), HMGB1 (B), c-fos (C) y sustancia P (D) en los ganglios raquídeos lumbares de animales controles y expuestos a oxaliplatino, 10 días después de iniciado el ciclo quimioterápico. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0.05$, *** $p < 0.001$).

Estos resultados sugieren una respuesta específica en la expresión génica, donde ATF-3 parece ser especialmente sensible al tratamiento con oxaliplatino, mientras que otras moléculas relacionadas con la respuesta celular y la señalización de dolor no mostraron alteraciones discernibles a nivel molecular en este contexto experimental.

En la médula espinal, mientras que los niveles de expresión de ATF-3 (Fig. 17A) y sustancia P (Fig. 17D) se mantuvieron similares a los detectados en animales controles, observamos un marcado aumento en los niveles de los ARNm que codifican para HMGB1 (Fig. 17B) y c-fos (Fig. 17C), sugiriendo la existencia de daño y activación celular a nivel espinal. Es importante destacar que este incremento en los niveles de expresión de HMGB1 podría estar contribuyendo a la activación de células gliales a nivel espinal (ver sección 4.1.3).

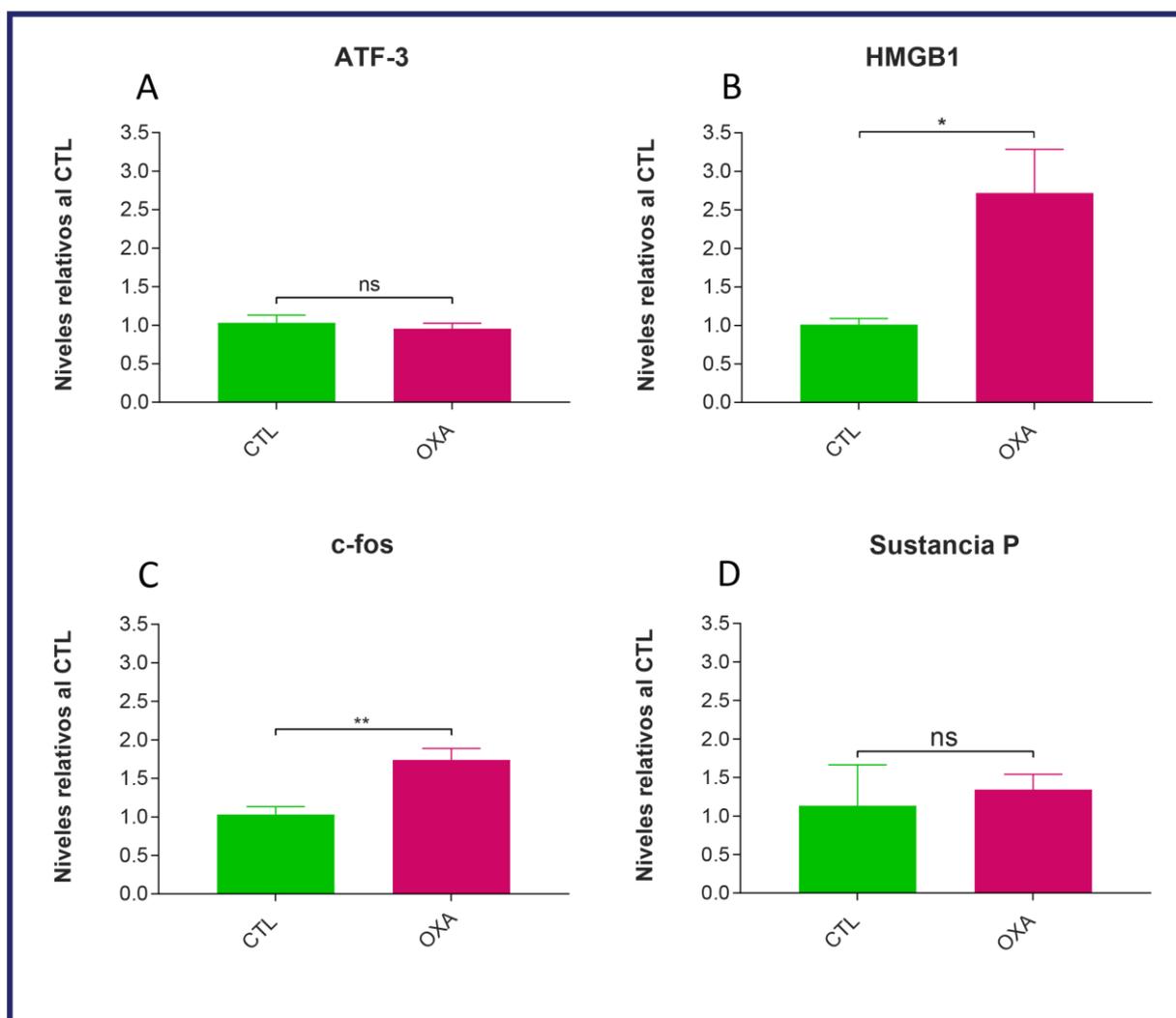


Figura 17. Niveles relativos de los ARNm de ATF-3 (A), c-fos (B), HMGB1 (C) y Sustancia P (D) en la médula espinal lumbar de animales controles y expuestos a oxaliplatino, 10 días después de iniciado el ciclo de quimioterapia. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Además, se analizaron los niveles de expresión de dos factores de crecimiento y supervivencia neuronal, las neurotrofinas NGF y BDNF, también involucradas en la activación de los circuitos nociceptivos. Observamos que la administración de oxaliplatino no modificó la expresión de las neurotrofinas en los ganglios (Fig. 18 A y B). Sin embargo, en la médula espinal, los niveles del ARNm que codifica para NGF se vieron disminuídos (Fig. 18C), sin detectarse cambios en los niveles del ARNm de BDNF (Fig. 18D).

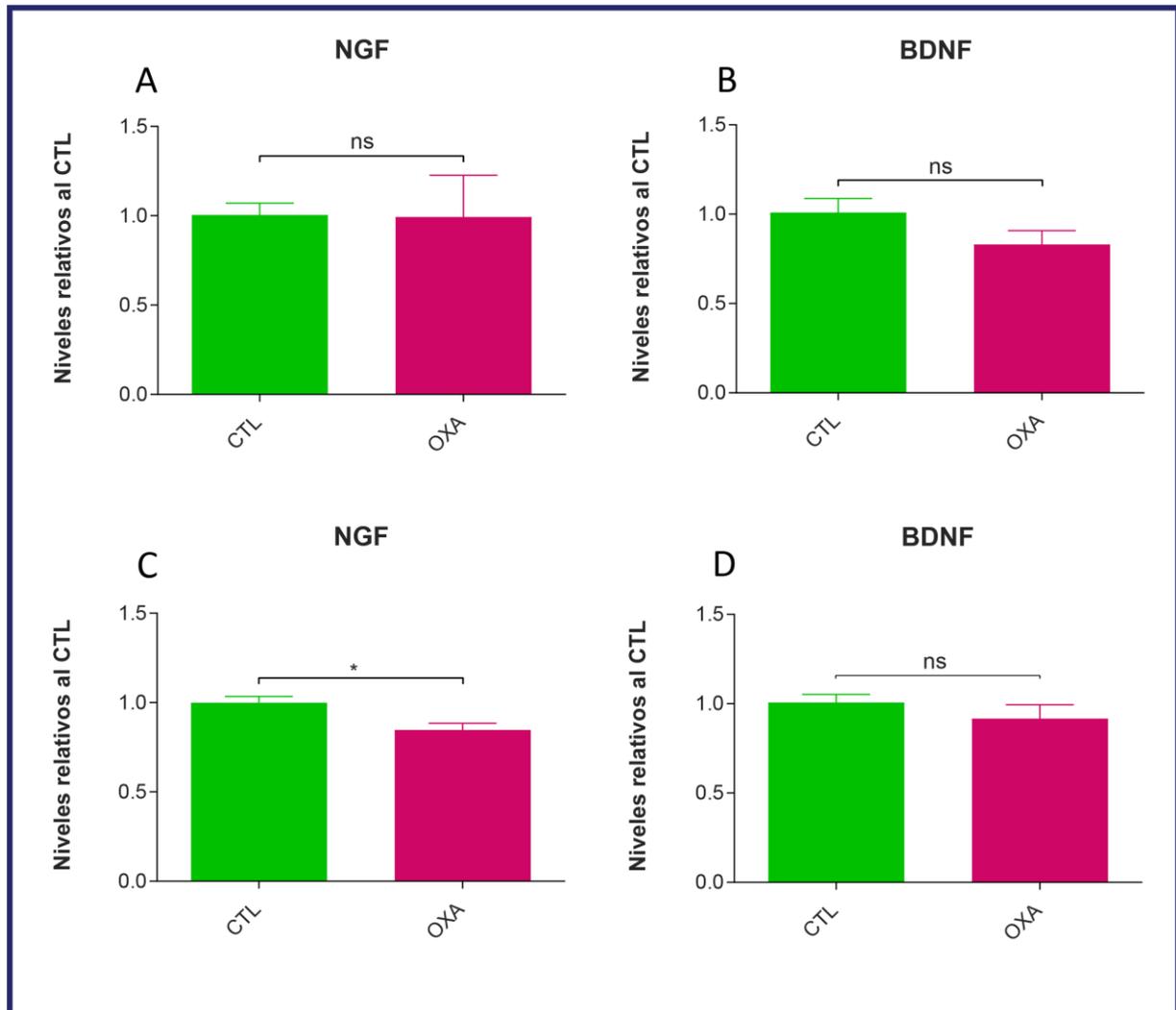


Figura 18. Niveles relativos al control de los ARNm que codifican para NGF y BDNF en los ganglios anexo a la raíz dorsal (A, B) y en la médula espinal lumbar (C, D) de animales controles y expuestos a oxaliplatino. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$).

Dado que detectamos cambios en la expresión del mensajero que codifica para NFG, a continuación, evaluamos los niveles proteicos del factor neurotrófico en los diferentes tejidos mediante la utilización de un kit comercial de ELISA. De este modo, detectamos un incremento significativo en los niveles de NGF, tanto en la piel (Fig. 19A) como en los ganglios raquídeos lumbares (Fig. 19B) de los animales que recibieron oxaliplatino. No se detectaron cambios en la médula espinal, observándose niveles similares a los detectados en animales controles (Fig. 19C). En su conjunto, estos resultados podrían sugerir una mayor producción del factor neurotrófico en los tejidos periféricos (piel) y su posterior transporte por vía axonal retrógrada hacia el soma de las neuronas aferentes primarias.

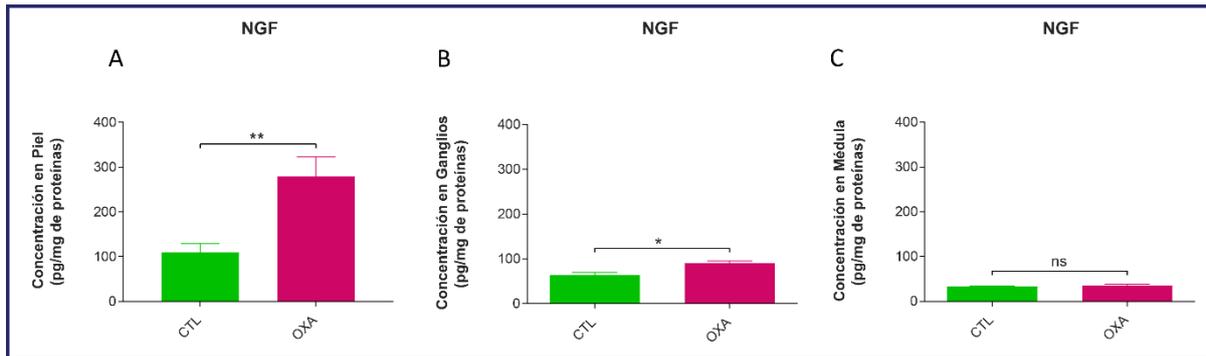


Figura 19. Niveles proteicos del factor neurotrófico NFG en homogenatos de piel plantar (A), ganglios anexos a la raíz dorsal (B) y médula espinal lumbar (C), evaluados mediante ELISA y expresados en función de la concentración total de proteínas de cada muestra. Las determinaciones fueron realizadas en tejidos disecados 10 días después del inicio del ciclo de quimioterapia. Se incluyeron 6 muestras por grupo experimental. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.1.3 Activación glial y producción de mediadores proinflamatorios

Dado que detectamos un aumento en los marcadores de daño y activación neuronal en los ganglios raquídeos y en la médula espinal lumbar de animales expuestos a oxaliplatino, incluyendo moléculas específicamente involucradas en la comunicación célula dañada – célula inmune/inflamatoria como es HMGB1, decidimos investigar los procesos de activación de células gliales y producción de mediadores pro-inflamatorios. Para ello, realizamos estudios utilizando RT-PCR en tiempo real e inmunofluorescencia en tejidos recolectados 10 días después de iniciar la administración del quimioterápico.

Los análisis moleculares revelaron un incremento en la expresión de GFAP en ambos tejidos (Fig. 20 A y C), indicando un aumento en los niveles del ARNm que codifica para la proteína glial tanto en las células satelitales de los ganglios raquídeos como en los astrocitos presentes en la médula espinal. Asimismo, observamos un aumento en la expresión de IBA-1, también en ambos tejidos (Fig. 20 B y D), sugiriendo su presencia en macrófagos infiltrantes y en células de la microglía, respectivamente.

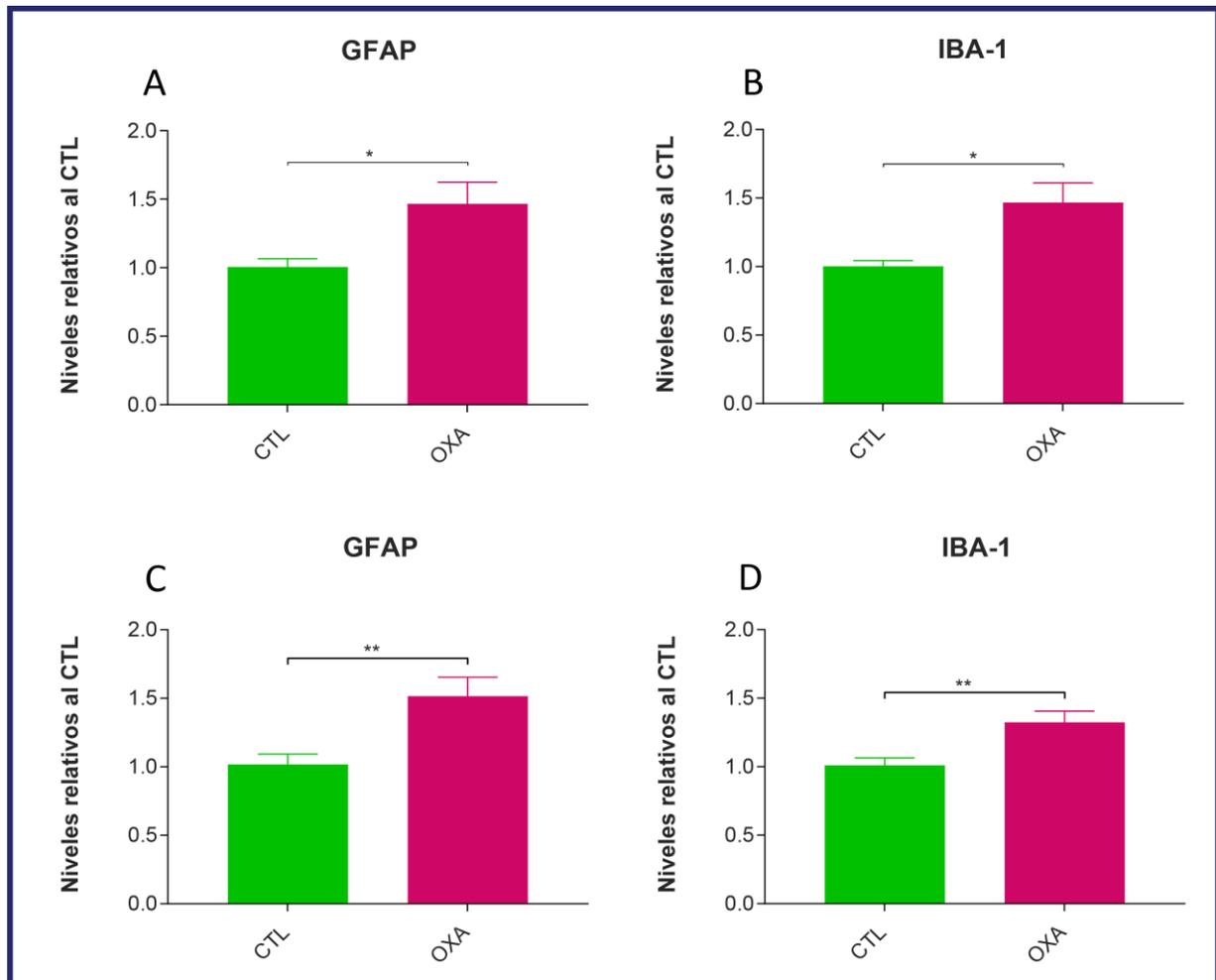


Figura 20. Niveles relativos al control de los ARNm que codifican para GFAP (A, C) e IBA-1 (B, D) en los ganglios raquídeos L4-6 (A, B) y en la médula espinal lumbar (C, D) de animales de los grupos CTL y OXA, 10 días después de iniciado el ciclo de oxaliplatino. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los valores que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados el test de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Dado que los estudios moleculares realizados brindan información sobre cambios en la expresión génica pero no permiten evaluar cambios proteicos ni identificar su localización a nivel tisular, decidimos complementar los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real estudiando la expresión de GFAP en ambos tejidos y de IBA-1 en la médula espinal, mediante inmunofluorescencia.

En los ganglios raquídeos de animales expuestos a oxaliplatino, identificamos un aumento en la inmunoreactividad para GFAP, observable a simple vista, 10 días después de iniciado el esquema quimioterápico (Fig. 21A). Mientras que en los ganglios de animales controles la señal inmunoreactiva fue mínima (Fig. 21A, panel superior), en los de animales expuestos al quimioterápico se observa claramente la marcación de las células satélite, localizadas rodeando los cuerpos neuronales (Fig. 21A, panel inferior). En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcados con el colorante DAPI (fluorescencia azul), que muestran la disposición perineuronal de las células satelitales.

Al cuantificar la intensidad de fluorescencia por unidad de área, detectamos un incremento significativo en los animales del grupo oxaliplatino en comparación con el grupo control (Fig. 21B). Estos hallazgos concuerdan con los resultados moleculares previamente obtenidos, demostrando que el aumento detectado en el ARNm de GFAP se traduce efectivamente en un aumento en la expresión de la proteína, e indicando que las células satelitales del ganglio se activan y sufren modificaciones funcionales luego de la exposición al quimioterápico.

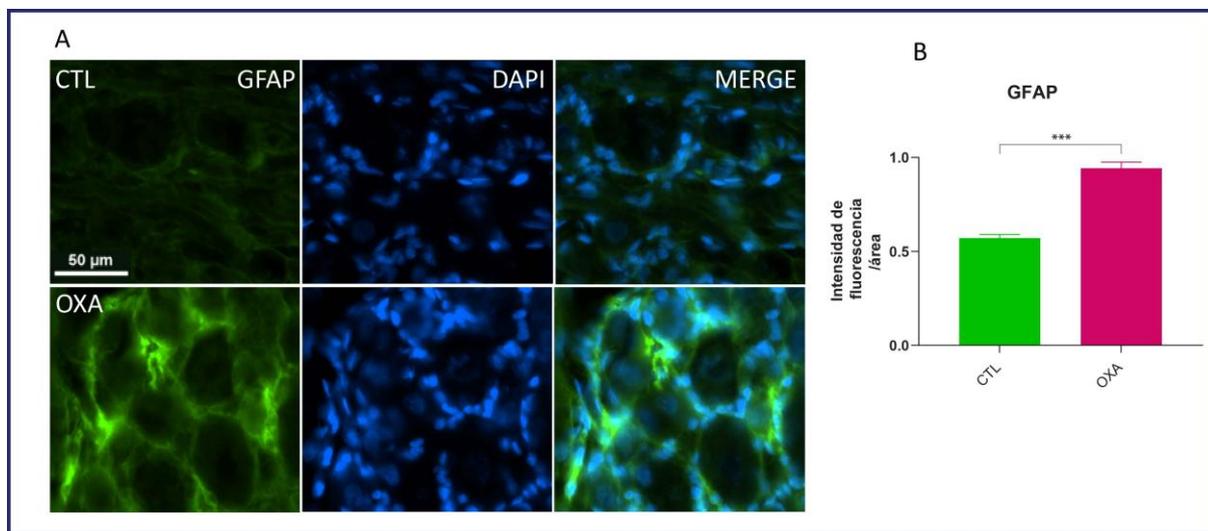


Figura 21. Imágenes representativas de la señal inmunoreactiva para GFAP en los ganglios anexos a la raíz dorsal L4-6 (A). En el panel superior se muestran fotografías de ganglios controles, mientras que en el panel inferior se muestran las correspondientes a animales tratados con oxaliplatino. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcados con el colorante DAPI (fluorescencia azul). Intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales (B). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados el test de Student (** $p < 0.01$).

Por su parte, en las secciones de la médula espinal lumbar observamos un incremento en la inmunomarcación para GFAP (Fig. 22) e IBA-1 (Fig. 23). Este aumento en la señal inmunoreactiva se localizó en las láminas I a VI del asta dorsal, lo que sugiere que la administración de oxaliplatino indujo la activación de astrocitos y microglía en regiones clave para el procesamiento de la información nociceptiva.

En las secciones correspondientes a los animales del grupo OXA (Fig. 22) se evidencian los cambios morfológicos característicos de la activación astrocitaria, incluyendo un aumento en el tamaño del cuerpo celular y un mayor número y grosor de sus prolongaciones, en comparación con los astrocitos observados en secciones de ganglios controles, los cuales presentan células de menor tamaño y prolongaciones más delgadas y finas.

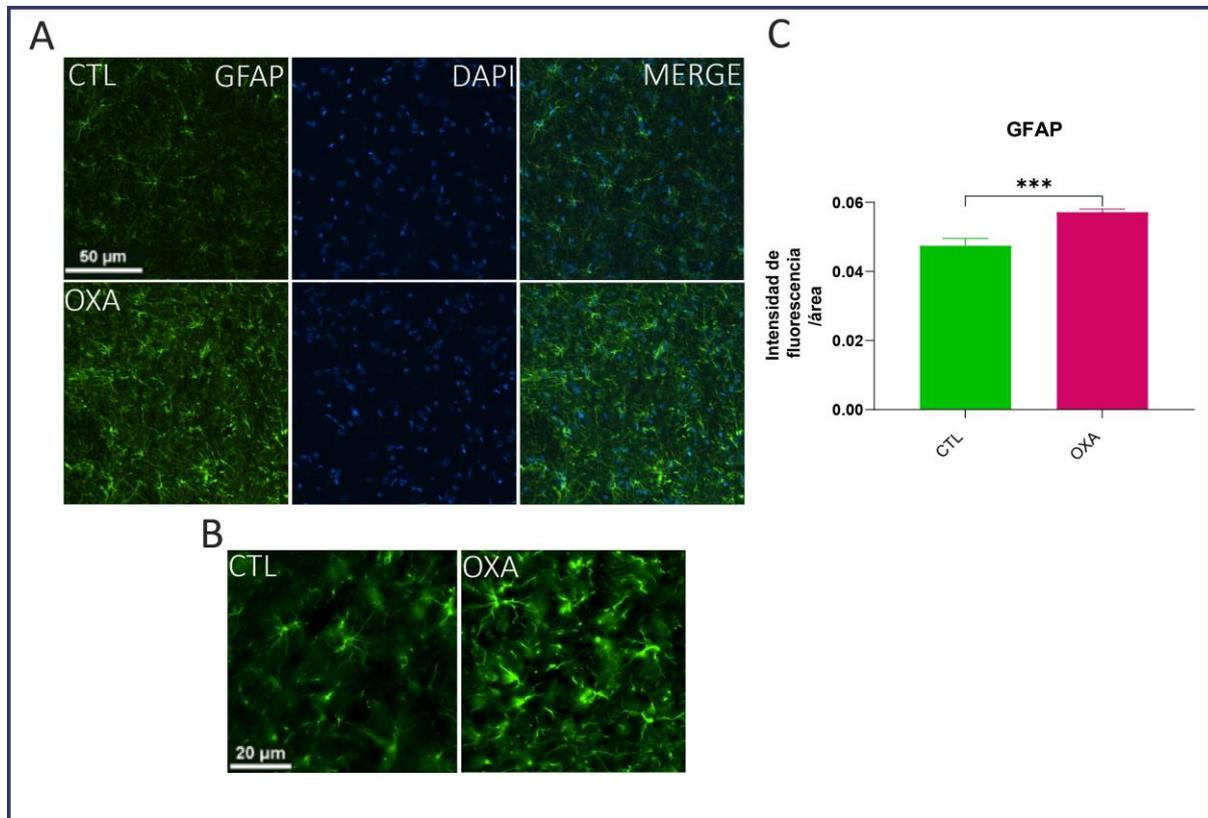


Figura 22. Imágenes representativas de la señal inmunoreactiva para GFAP en la médula espinal lumbar (A). En el panel superior se muestran fotografías de secciones de ganglios controles, mientras que en el panel inferior se muestran las correspondientes a secciones obtenidas a partir de animales tratados con oxaliplatino. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcados con el colorante DAPI (fluorescencia azul). En (B) se muestran imágenes a mayor aumento que permiten apreciar la morfología de las células marcadas, y en (C) se representa la intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales. Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (***) $p < 0.001$.

En el caso de las secciones inmunomarcadas para IBA-1, se observa también un aumento en la señal inmunoreactiva en el asta dorsal de los animales del grupo OXA (Fig. 23), junto con modificaciones morfológicas compatibles con la activación microglial, tales como el agrandamiento del soma y la retracción y engrosamiento de las prolongaciones.

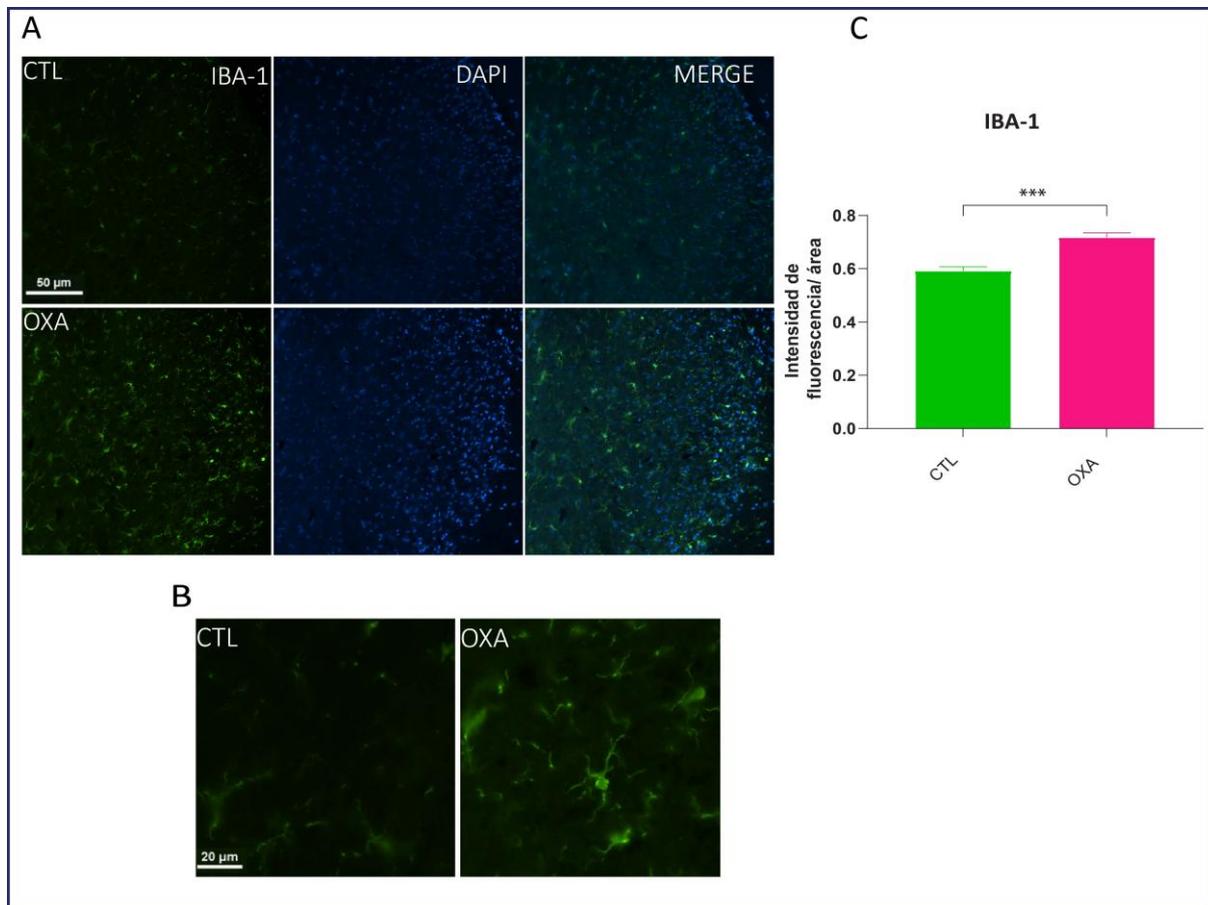


Figura 23. Imágenes representativas de la señal inmunoreactiva para IBA-1 (A) en la médula espinal lumbar. En el panel superior se muestran fotografías de secciones de ganglios controles, mientras que en el panel inferior se muestran las correspondientes a secciones obtenidas a partir de animales tratados con oxaliplatino. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcados con el colorante DAPI (fluorescencia azul). En (B) se muestran imágenes a mayor magnificación para apreciar la morfología de las células marcadas, y en (C) se representa la intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales. Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (***) $p < 0.001$.

Como se comentó en los párrafos anteriores, al cuantificar la intensidad de fluorescencia por unidad de área detectamos un aumento significativo de la señal inmunoreactiva específicamente localizada en el área delimitada por las láminas I-VI (asta dorsal completa) de secciones inmunomarcadas para GFAP (Fig. 22A y Fig. 24A) o IBA-1 (Fig. 23A y Fig. 25A).

A fin de poder circunscribir los cambios detectados a regiones funcionales específicas, también llevamos a cabo un análisis detallado en las subregiones funcionales (láminas I-II, III-IV y V-VI). En el caso de GFAP, los animales tratados con el quimioterápico mostraron un incremento significativo de la señal inmunoreactiva en astrocitos localizados en todas las láminas evaluadas: I-II (Fig. 24B), III-IV (Fig. 24C) y V-VI (Fig. 24D).

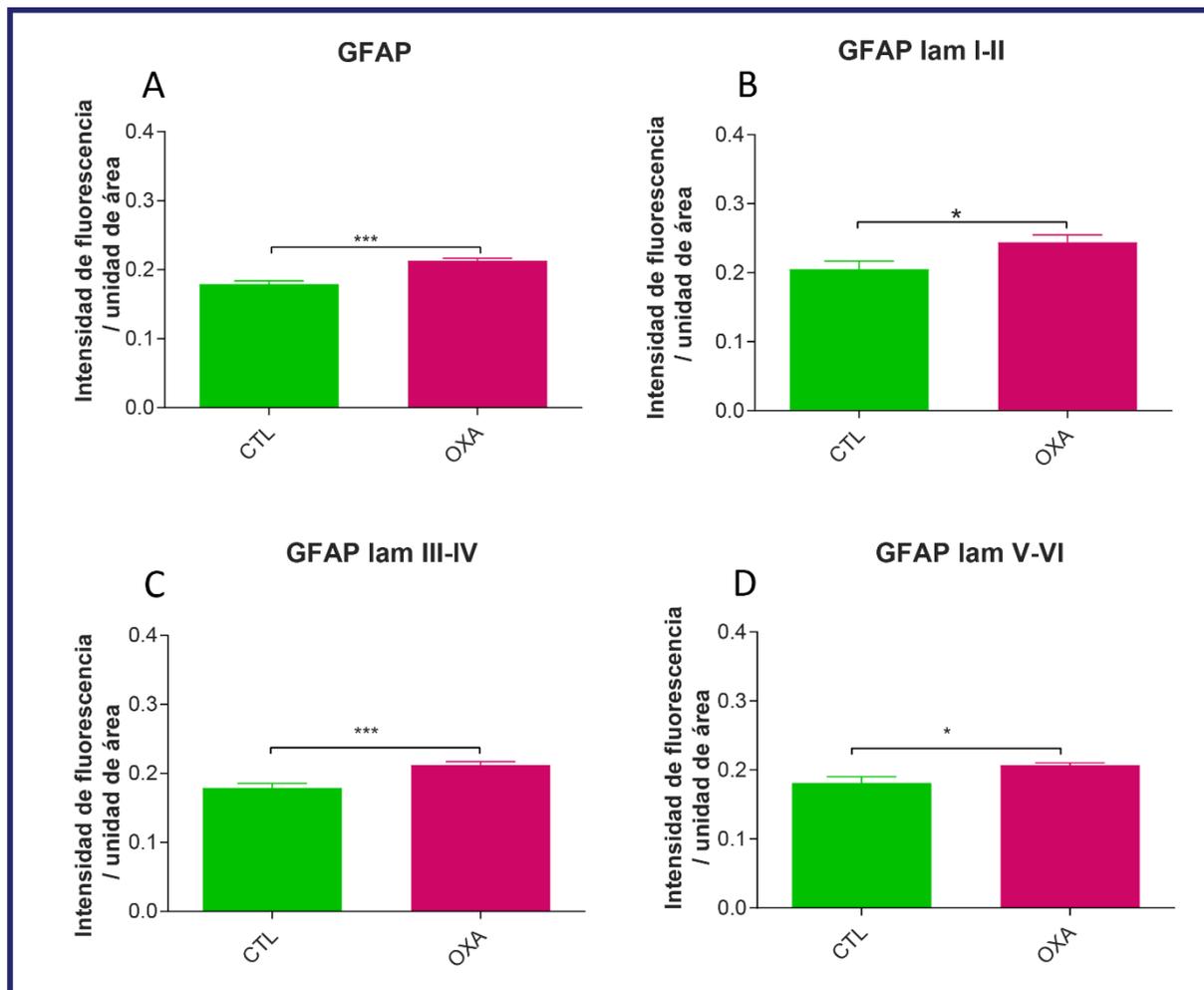


Figura 24. Intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área. La cuantificación se realizó en el asta dorsal completa de la médula espinal (A) y en las diferentes áreas funcionales, láminas I-II (B), III-IV (C) y V-VI (D). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los datos que se muestran en los gráficos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Por su parte, la señal inmunoreactiva de IBA-1 también mostró un aumento significativo en las láminas I-II (Fig. 25B) y V-VI (Fig. 25D), mientras que en las láminas III-IV se observaron niveles ligeramente superiores a los controles (Fig. 25C), aunque sin alcanzar significancia estadística.

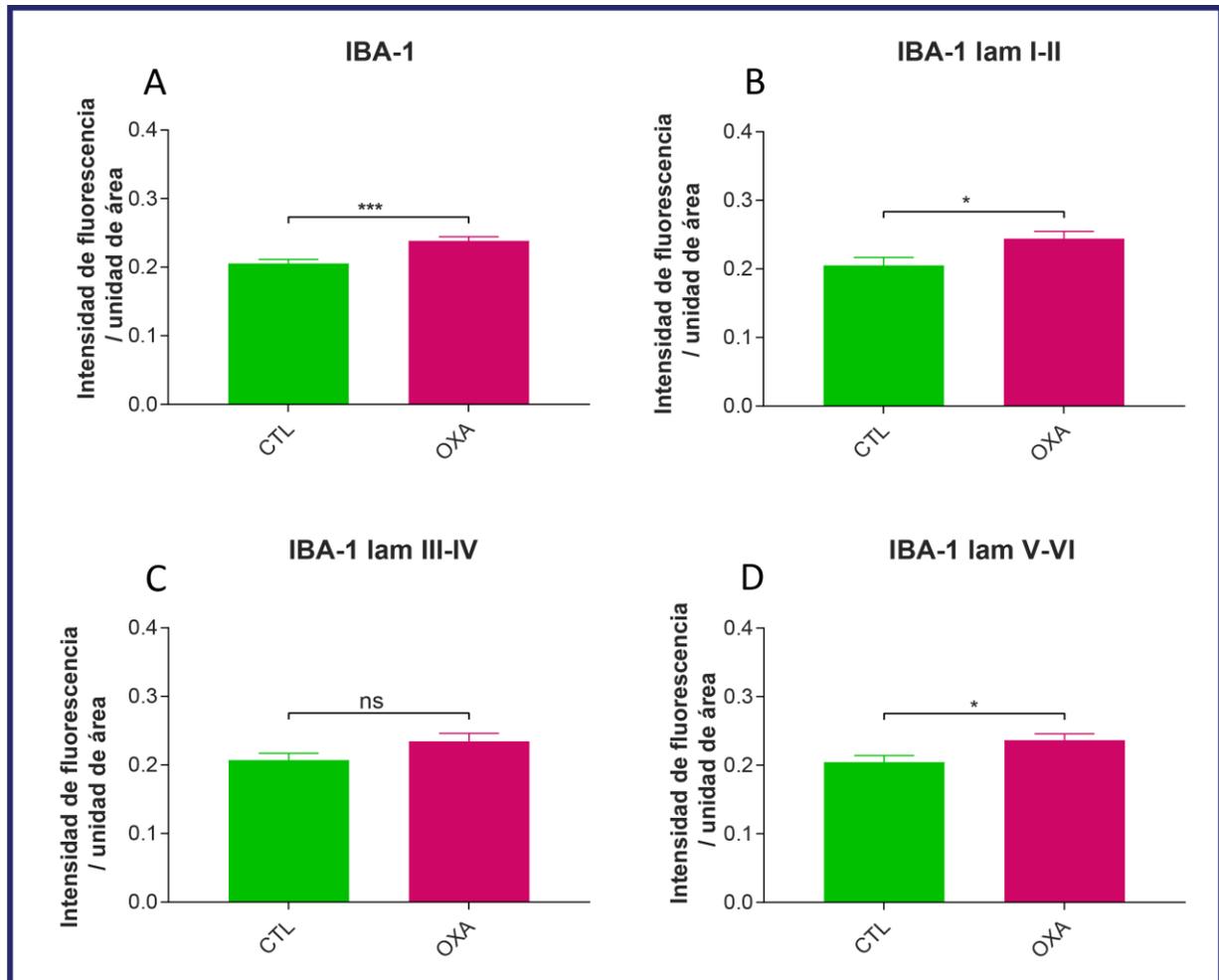


Figura 25. Intensidad de fluorescencia de IBA-1 por unidad de área. La cuantificación se realizó en el asta dorsal completa de la médula espinal (A) y en las diferentes áreas funcionales, láminas I-II (B), III-IV (C) y V-VI (D). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los datos que se muestran en los gráficos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el oxaliplatino genera cambios funcionales en astrocitos y células microgliales en áreas específicas de la médula espinal involucradas en la neurotransmisión del dolor.

Dado que tanto las células gliales como los macrófagos infiltrantes tienen la capacidad de producir y secretar citoquinas pro- y anti-inflamatorias, con acciones moduladoras directas sobre la excitabilidad neuronal y, en consecuencia, sobre la neurotransmisión del dolor, decidimos evaluar diferentes mediadores involucrados en estos procesos. En particular, analizamos los niveles de expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NFκB, responsable de regular la expresión de diferentes mediadores pro-inflamatorios, así como las citoquinas pro-inflamatorias IL-1β y TNFα y las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGFβ.

En los animales que recibieron oxaliplatino detectamos un marcado aumento en los niveles de los ARNm que codifican para NFκB (Fig. 26 A y D), TNFα (Fig. 26 B y E) e IL1β (Fig. 26 C y F), tanto en los ganglios raquídeos L4-6 (Fig. 26 A-C) como en la médula espinal lumbar (Fig. 26 D-F).

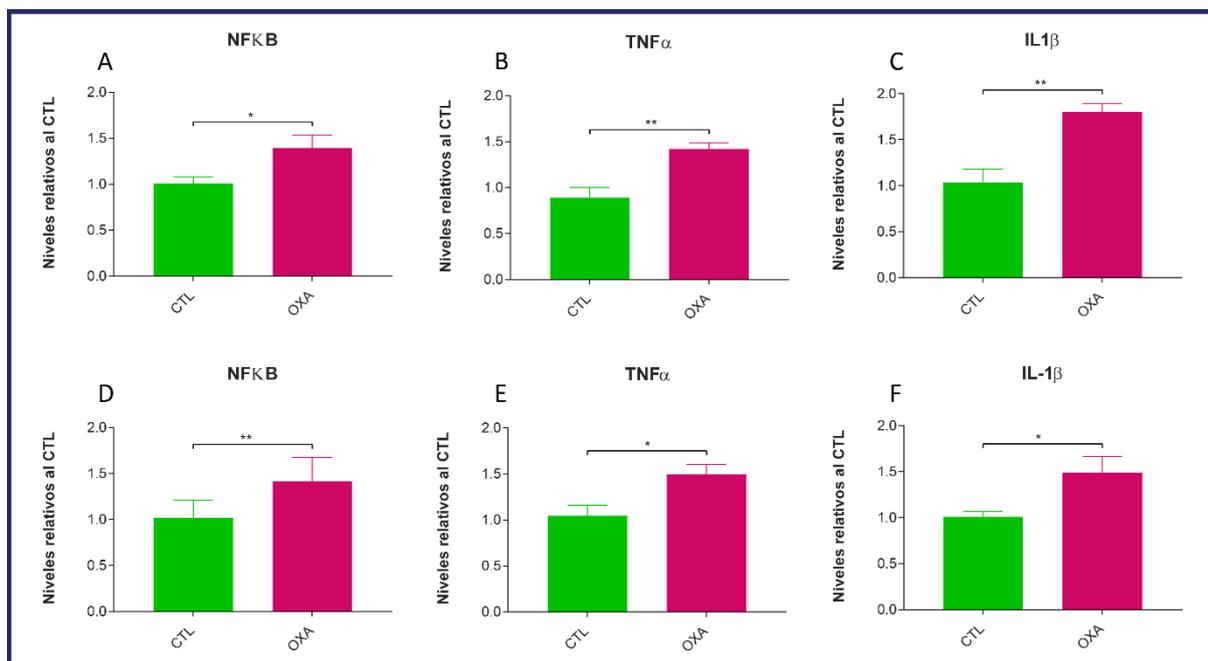


Figura 26. Niveles relativos al control de los ARNm de NFκB, TNFα e IL-1β detectados en los ganglios raquídeos L4-6 (A-C) y la médula espinal lumbar (D-F) de animales pertenecientes a los grupos control y oxaliplatino, 10 días después de iniciado el ciclo de quimioterapia. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos que se muestran corresponden a la media ± SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (* p<0.05, ** p<0.01).

En cuanto a las citoquinas anti-inflamatorias, mientras que los niveles del mensajero de IL-10 se mantuvieron en valores basales tanto en ganglios (Fig. 27A) como en médula (Fig. 27C), los niveles del mensajero de TGF β mostraron un incremento significativo en la médula de animales expuestos a oxaliplatino (Fig. 27D), sin detectarse cambios en relación a animales controles en los ganglios raquídeos (Fig. 27B).

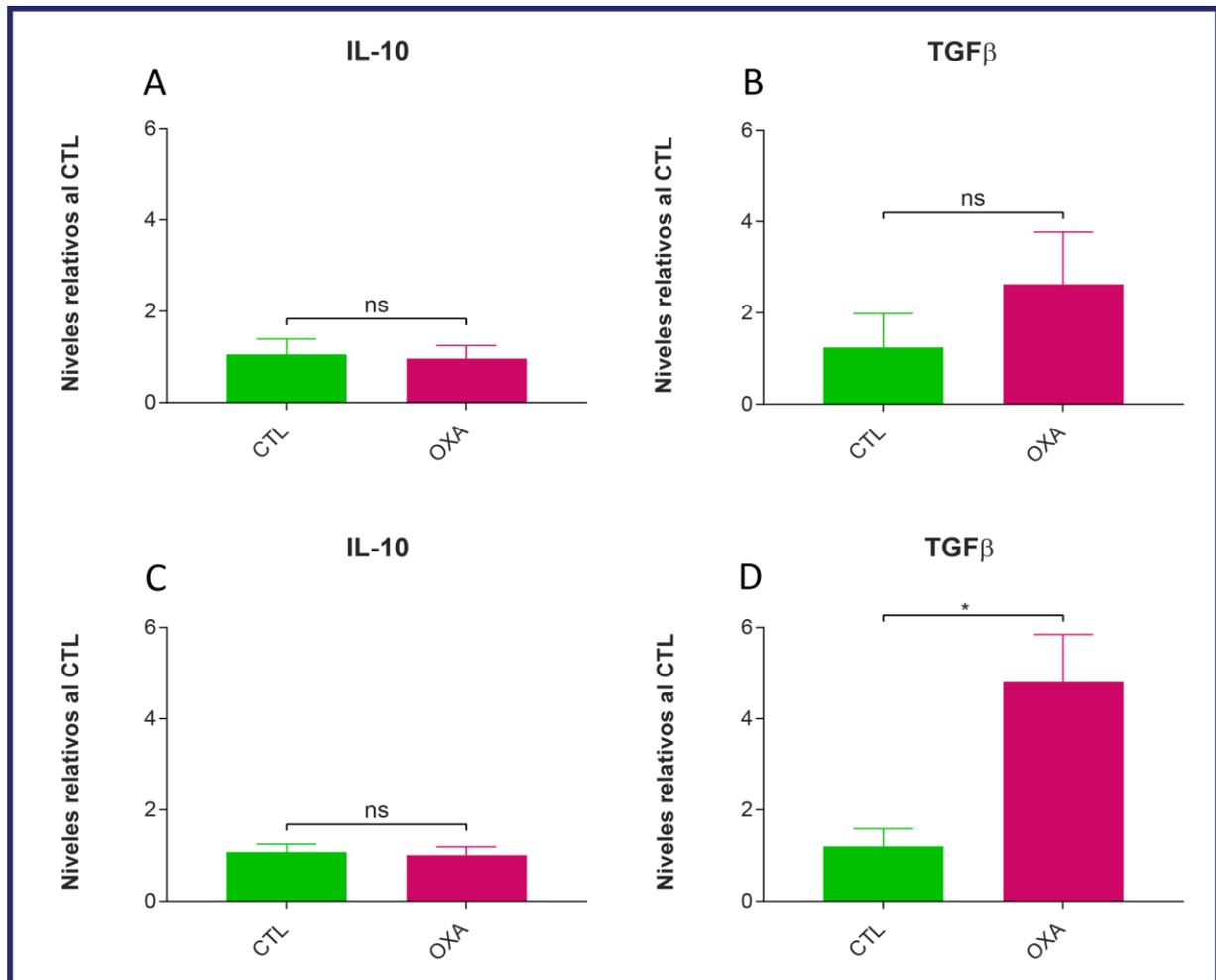


Figura 27. Niveles relativos de los ARNm de IL-10 y TGF β detectados en los ganglios anexos a la raíz dorsal L4-6 (A, B) y en la médula espinal lumbar (C, D). Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$).

4.2 Cambios conductuales inducidos por oxaliplatino

Una vez estudiados los efectos neurotóxicos desencadenados por oxaliplatino en estructuras clave de la neurotransmisión nociceptiva, nos propusimos evaluar si estos procesos estaban asociados con alteraciones conductuales específicas. Para ello, se llevaron a cabo estudios en ratas macho tratadas con oxaliplatino o vehículo, las cuales fueron evaluadas periódicamente mediante pruebas conductuales. Estas pruebas incluyeron la evaluación de dolor inducido (alodinia mecánica y térmica fría), indicadores de dolor espontáneo (como acicalamiento, posturas antálgicas y evolución del peso corporal), y parámetros relacionados con la locomoción (distancia recorrida, velocidad de desplazamiento y tiempo de inmovilidad). Con el objeto de analizar estos parámetros antes, durante y después de finalizado el tratamiento con oxaliplatino, los estudios fueron diseñados para permitir el seguimiento a largo plazo.

4.2.1 Desarrollo de alodinia mecánica y térmica fría

Al evaluar el comportamiento de los animales ante la estimulación mecánica mediante la prueba de von Frey, se observó que, en el grupo control, el umbral de retirada se mantuvo constante y similar a los valores basales a lo largo de todo el período experimental, con un valor promedio cercano a los 26 gramos (Fig. 28A). En contraste, los animales que recibieron oxaliplatino mostraron una disminución significativa en el umbral de retirada frente a la estimulación con los filamentos de von Frey. Esta reducción fue evidente desde el inicio de la administración del quimioterápico y se estabilizó en valores cercanos a los 10 g a partir del día 7, lo que indica el desarrollo de hipersensibilidad a estímulos mecánicos (Fig. 28A).

Esta hipersensibilidad mecánica, reflejada en la disminución significativa del umbral de retirada en las patas traseras, se mantuvo durante todo el ciclo de administración de oxaliplatino y persistió incluso después de finalizado el tratamiento, hasta la finalización del estudio (Fig. 28A). Además, se registró que el 40% de los animales tratados con oxaliplatino presentaron umbrales de retirada ≤ 6 g en al menos dos de los puntos temporales evaluados, lo que sugiere la presencia de alodinia mecánica. Estos hallazgos indican que la administración de oxaliplatino indujo hipersensibilidad mecánica de desarrollo temprano y sostenido en el tiempo, acompañada de signos de alodinia.

Al evaluar el comportamiento de los animales ante la estimulación térmica fría en las patas traseras mediante la prueba de Choi, se observó que, en el grupo control, el número de respuestas positivas se mantuvo constante y similar a los valores basales a lo largo de todo el período evaluado, con un valor promedio cercano a 1 respuesta positiva (Fig. 28B). En contraste, los animales que recibieron oxaliplatino mostraron un aumento significativo en el número de respuestas positivas ante la estimulación con acetona, detectable desde el primer día de administración del quimioterápico (Fig. 28B), lo que sugiere el desarrollo de hipersensibilidad térmica al frío.

Esta hipersensibilidad, evidenciada por un incremento en el número de retiradas bruscas de las patas traseras, se mantuvo durante todo el ciclo de administración de oxaliplatino y persistió incluso después de finalizado el mismo (Fig xB). Además, se observó que el 80% de los animales tratados con oxaliplatino presentaron respuestas positivas a la estimulación con acetona en al menos dos de los puntos experimentales evaluados, lo que sugiere la presencia de alodinia al frío (Fig. 28B). Estos hallazgos indican que la administración de oxaliplatino indujo hipersensibilidad térmica de desarrollo temprano y sostenido en el tiempo, acompañada de signos de alodinia.

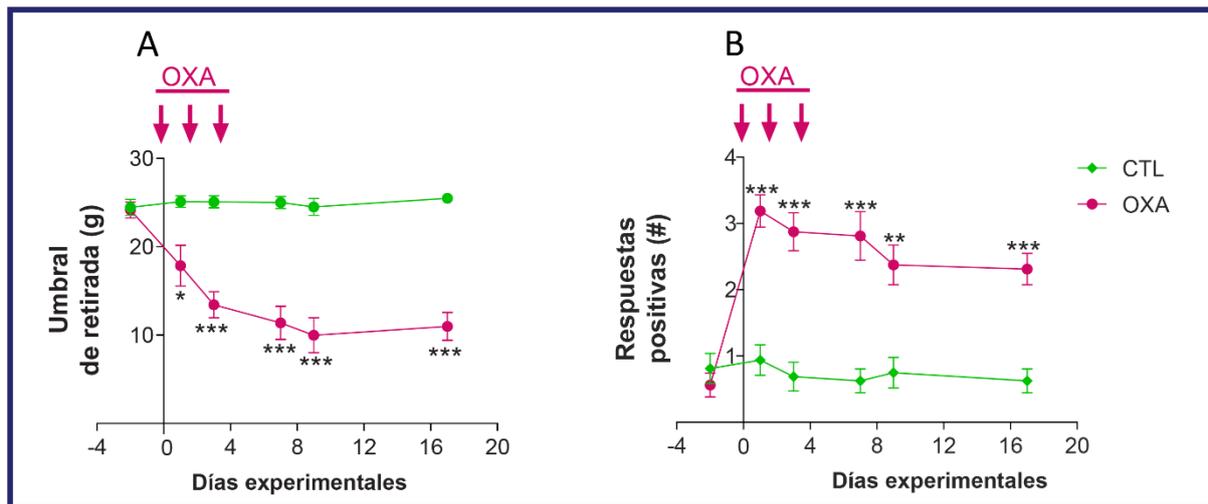


Figura 28. Umbral de retirada de las patas traseras de los animales frente a estímulos mecánicos, evaluado con la prueba de von Frey (A) y número de respuestas positivas frente a estímulos térmicos fríos, evaluado mediante la prueba de Choi (B). Las flechas indican el periodo de administración del quimioterápico (OXA) o el vehículo (SF). Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas seguido por el test de Bonferroni. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas, utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.2 Ausencia de indicadores de dolor espontáneo

Al hacer el seguimiento diario de los animales, no observamos cambios en el pelaje como falta de limpieza o presencia de placas alopecias, indicadores de un acicalado deficiente o excesivo, respectivamente. Tampoco se detectaron posturas antálgicas como retracción de los miembros, actitudes de guardado de los mismos o alguna postura que evidenciara la presencia de dolor.

Los resultados de los estudios de evolución del peso corporal, otro parámetro que puede ser indicativo de la presencia de dolor espontáneo, se muestran en el siguiente apartado.

4.2.3 Cambios en el peso corporal y el consumo de alimento

Al analizar la curva de crecimiento de los animales controles se observó un aumento sostenido del peso corporal durante todo el período de estudio (Fig. 29A). Por el contrario, los animales que recibieron oxaliplatino, mostraron una atenuación en la curva de crecimiento a partir del momento en el que comenzó la administración del quimioterápico y durante todo el período evaluado (Fig. 29A). Esta atenuación en el crecimiento adquirió significancia estadística a partir del día 8 y se mantuvo los días 11, 16, 21 y 25 (Fig. 29A). Cabe destacar que los animales que recibieron el quimioterápico en ningún momento evidenciaron una disminución de su peso corporal, pero sí una atenuación marcada en la tasa de crecimiento.

A fin de analizar si esta atenuación se debía a una menor ingesta, evaluamos el consumo de alimento a lo largo de todo el período experimental. Como se observa en la Fig 29B, el consumo de alimento, expresado como peso de alimento consumido relativizado por el peso total de los animales de la jaula, fue similar en ambos grupos experimentales antes, durante y después del ciclo quimioterápico. Sin embargo, durante el período de administración de oxaliplatino o solución fisiológica, según el grupo, se observó una reducción significativa del consumo en relación a los valores basales (Fig. 29B). Esta disminución no sería atribuida al quimioterápico, ya que se observa en ambos grupos, sino que podría deberse a la situación de estrés que atraviesan los animales al ser reiteradamente manipulados e inyectados.

Una vez finalizado el período de administración de oxaliplatino o solución fisiológica, los animales controles tendieron a recuperar el consumo habitual, mientras que los animales del grupo OXA mantuvieron un consumo reducido (Fig. 29B). Estos hallazgos sugieren que la administración de oxaliplatino indujo una reducción sostenida en el consumo de alimento (Fig. 29B) que se ve reflejada en una atenuación en la curva de crecimiento (Fig. 29A).

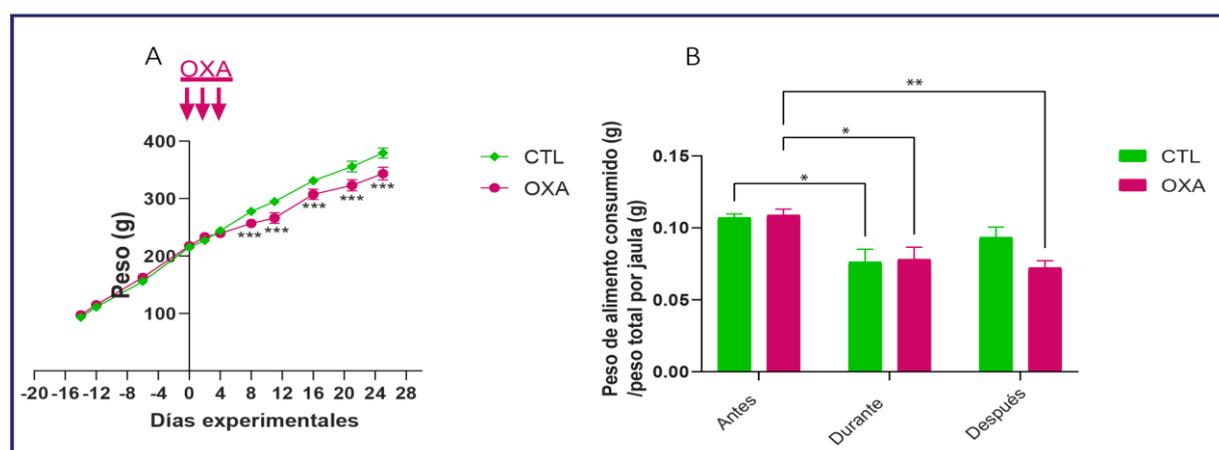


Figura 29. (A) Curvas de crecimiento de los animales. Las flechas indican el periodo de administración del quimioterápico (OXA) o el vehículo (SF). (B) Consumo de alimento de animales controles y animales expuestos a oxaliplatino, antes, durante y después de la administración del quimioterápico. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test ANOVA de 2 vías de medidas repetitivas seguido por el test de Bonferroni. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas, utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.4 Alteraciones en parámetros relacionados a locomoción

A fin de analizar si la neurotoxicidad del oxaliplatino conducía también a alteraciones en la locomoción, decidimos evaluar algunos parámetros relacionados a actividad locomotora utilizando la prueba de campo abierto. Al analizar los resultados obtenidos, no observamos diferencias entre ambos grupos experimentales en los parámetros de distancia recorrida, velocidad promedio y tiempo de inmovilidad, en ninguno de los períodos de tiempo evaluados: antes (día -5), durante (día 2) y después (día 9) de la administración del quimioterápico (Fig. 30).

Al analizar estos parámetros a lo largo del tiempo, observamos una disminución significativa exclusivamente en la distancia recorrida por el grupo OXA (Fig. 30A). Además, tanto en el grupo CTL como en el grupo OXA, se identificó una tendencia hacia una reducción en la distancia recorrida y la velocidad promedio, junto con una tendencia al aumento en el tiempo de inmovilidad hacia el final del período experimental (Fig. 30A-C).

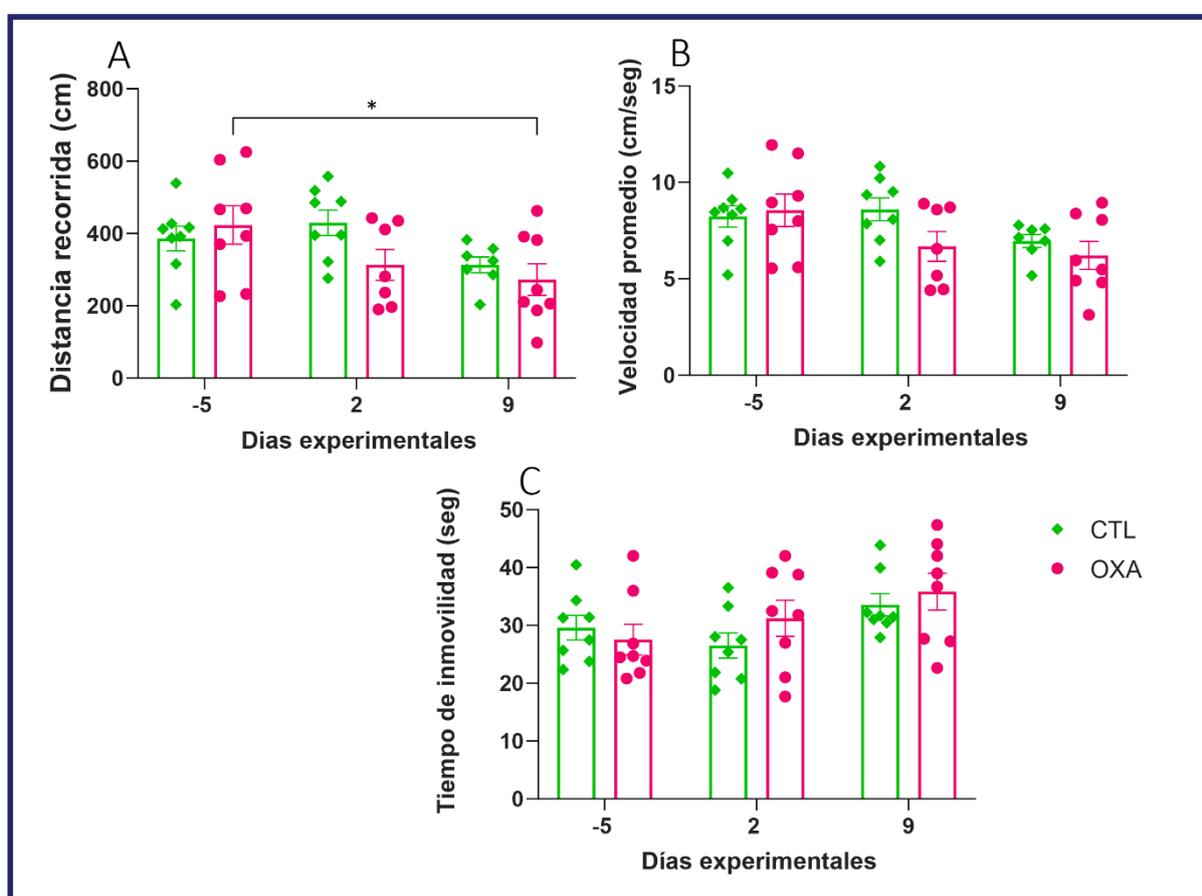


Figura 30. Parámetros asociados a locomoción: distancia recorrida (A), velocidad promedio (B) y tiempo de inmovilidad (C) evaluados mediante la prueba de campo abierto y analizados con el software Image J. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test ANOVA de 2 vías de medidas repetidas seguido por el test de Tukey para comparar entre tratamientos y el test de Bonferroni para comparar dentro de cada tratamiento a lo largo del tiempo. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas identificadas (* $p < 0,05$).

Proyecto II

Tras caracterizar los cambios conductuales y moleculares inducidos por oxaliplatino en ratas macho, y considerando la evidencia previa que indica diferencias sexuales tanto en las manifestaciones como en los mecanismos subyacentes al dolor crónico y a la NPIQ, decidimos investigar similitudes y diferencias en nuestro modelo experimental. Estos estudios se realizaron en animales de ambos sexos que recibieron oxaliplatino o vehículo y que fueron evaluados simultáneamente. Los análisis conductuales se llevaron a cabo en protocolos de largo plazo mientras que los estudios moleculares se realizaron en tejidos recolectados 10 días después del inicio del esquema quimioterápico en protocolos de corto plazo, como se muestra en la figura 10A de Materiales y Métodos.

4.3 Alteraciones conductuales inducidas por oxaliplatino en ratas hembra: similitudes y diferencias con las observadas en machos

4.3.1 Alteraciones en parámetros relacionados a locomoción

Dado que finalizamos la sección anterior con la descripción de los resultados obtenidos al evaluar distintos parámetros asociados a locomoción en ratas macho, iniciamos este nuevo segmento con la presentación del análisis de estos mismos estudios comportamentales realizados en hembras.

De manera similar a lo observado en machos (sección 4.2.4), las ratas hembra tratadas con oxaliplatino mostraron comportamientos comparables al grupo CTL en los parámetros de distancia recorrida (Fig. 31A), velocidad promedio (Fig. 31B) y tiempo de inmovilidad (Fig. 31C) en la prueba de campo abierto. De hecho, no se observaron diferencias entre animales controles y animales expuestos a oxaliplatino en ninguno de los períodos evaluados: antes (día -5), durante (día 2) o después (día 9) de la administración del quimioterápico.

Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas en el grupo OXA en función del tiempo en los 3 parámetros evaluados. La distancia recorrida (Fig. 31A) y la velocidad promedio (Fig. 31B) mostraron valores significativamente menores al basal, tanto durante como después de la administración de antineoplásico. Además, el tiempo de inmovilidad (Fig. 31C) fue significativamente mayor al basal los días 2 y 9 del esquema experimental. En contraste, el grupo CTL mostró cambios significativos únicamente en la velocidad promedio que disminuyó significativamente una vez finalizado el ciclo de quimioterapia (Fig. 31B). Estos hallazgos sugieren que la tendencia natural que muestran los animales controles a reducir la actividad locomotora en las sucesivas pruebas de campo abierto, se ve acentuada en las hembras expuestas a oxaliplatino, con una reducción general en la locomoción.

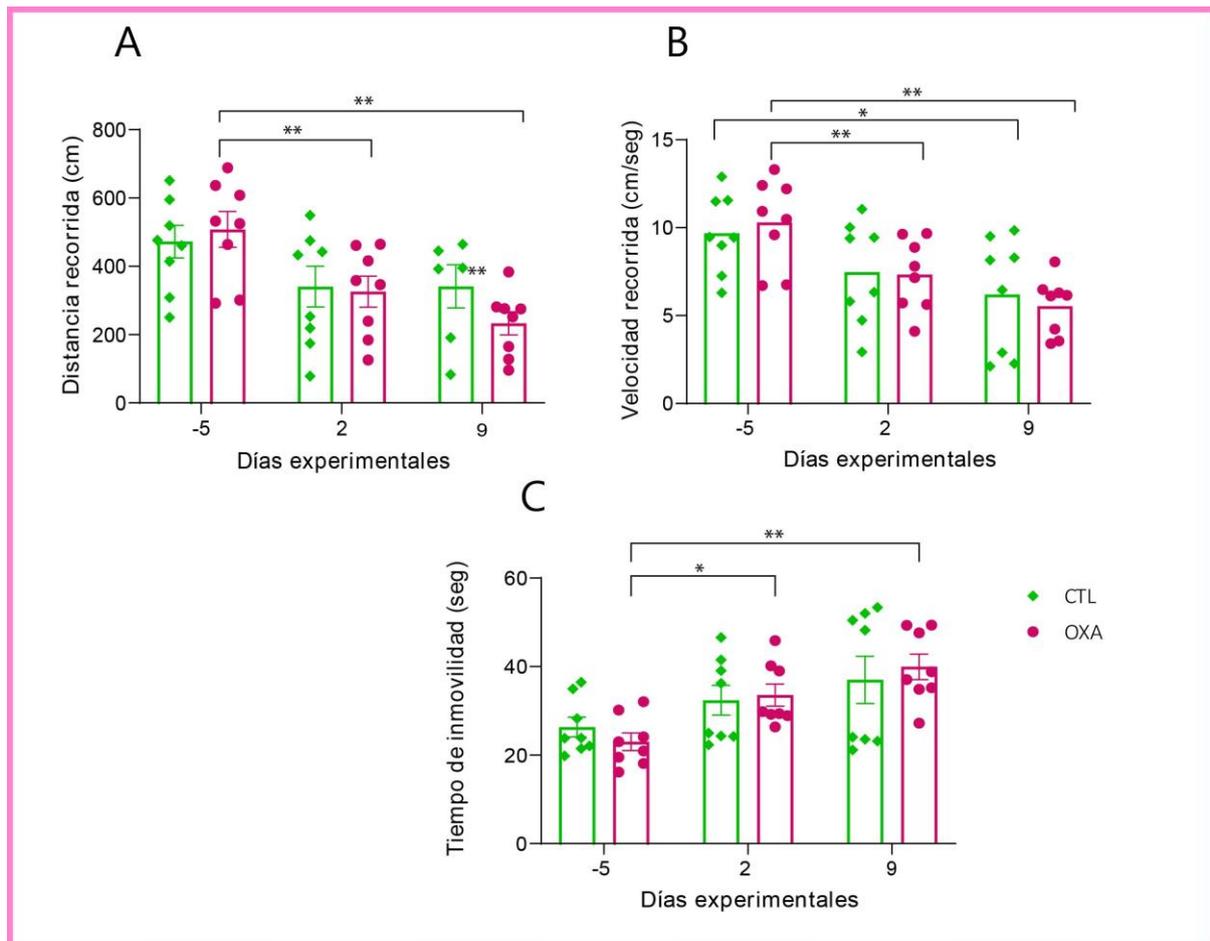


Figura 31. Parámetros asociados a locomoción en ratas hembra: distancia recorrida (A), velocidad promedio (B) y tiempo de inmovilidad (C) evaluados mediante la prueba de campo abierto y analizados con el software Image J. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test ANOVA de 2 vías de medidas repetitivas seguido por el test de Tukey para comparar entre tratamientos y el test de Bonferroni para comparar dentro de cada tratamiento a lo largo del tiempo. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas, utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Además, a diferencia del perfil observado en los machos —donde solo se registró una disminución significativa en la distancia recorrida una vez finalizado el ciclo de quimioterapia (sección 4.2.4)—, en las hembras se evidenciaron alteraciones en los tres parámetros asociados a la locomoción, tanto durante como después del tratamiento quimioterápico.

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en machos y en hembras, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos en los parámetros de distancia recorrida (Fig. 32A), velocidad promedio (Fig. 32B) y tiempo de inmovilidad (Fig. 32C) en ninguno de los períodos experimentales evaluados (Fig 32, $p>0,05$ en todas las comparaciones entre sexos).

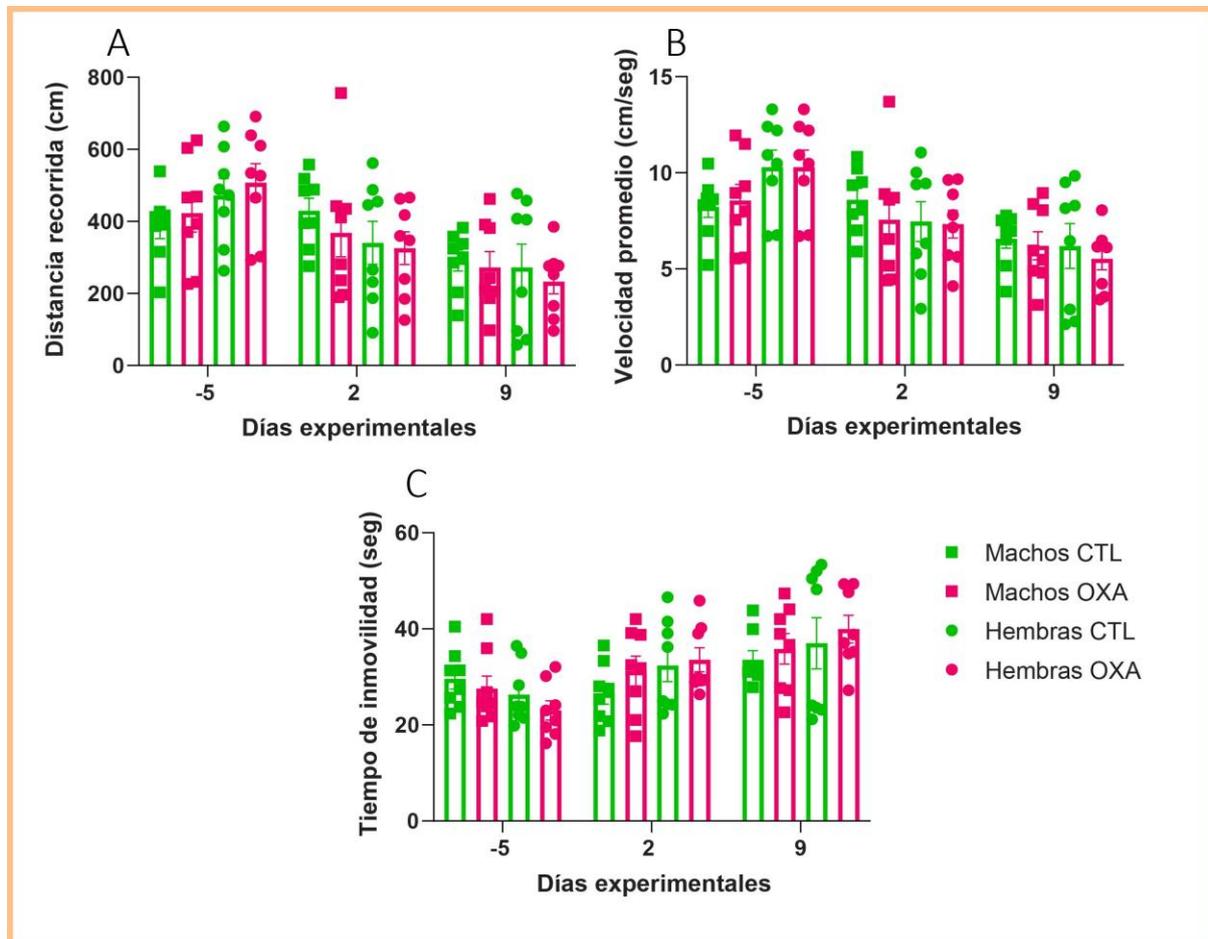


Figura 32. Parámetros asociados a locomoción en ratas de ambos sexos: distancia recorrida (A), velocidad promedio (B) y tiempo de inmovilidad (C). Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test ANOVA de 2 vías de medidas repetitivas seguido por el test de Tukey para comparar entre sexos, en cada uno de los períodos experimentales. Todas las comparaciones realizadas entre machos y hembras del mismo grupo experimental (CTL u OXA) resultaron ser no significativas ($p>0.05$).

4.3.2 Ausencia de indicadores de dolor espontáneo

En forma similar a lo observado en machos (sección 4.2.2), al hacer la evaluación diaria de las ratas hembra, no se observaron cambios en el pelaje como falta de limpieza o presencia de placas alopécicas, indicadores de un acicalado deficiente o excesivo, respectivamente. Tampoco se detectaron posturas antálgicas como la retracción de los miembros, actitud de guardado de los mismos o alguna postura que evidenciara la presencia de dolor.

4.3.3 Cambios en el peso y el consumo de alimento

Al evaluar los efectos del oxaliplatino sobre el aumento de peso corporal en ratas hembra (Fig. 33A), observamos que, al igual que en los machos (sección 4.2.3), la administración del quimioterápico provocó una atenuación significativa en la curva de crecimiento, evidente a partir del día 10 del esquema experimental (Fig. 33B). Esta reducción en la tasa de crecimiento se mantuvo en el largo plazo (días 13, 15 y 17), en contraste con los animales control que mostraron un aumento sostenido del peso durante todo el período de estudio (Fig. 33B).

Es importante destacar que, si bien las ratas tratadas con oxaliplatino no experimentaron pérdida de peso en ningún momento, sí presentaron una desaceleración marcada en su crecimiento en comparación con los controles. Además, dado que las hembras del grupo OXA tenían un peso promedio inicial ligeramente mayor al de las ratas controles, incorporamos el análisis del porcentaje de aumento de peso en relación al peso basal de cada grupo para normalizar estas diferencias iniciales (Fig. 33B).

Siendo que una posible causa de la menor tasa de crecimiento podría ser la reducción en la ingesta, analizamos el consumo de alimento durante todo el período experimental (Fig. 33C). Ambos grupos experimentales consumieron cantidades similares de alimento tanto antes como durante y después del ciclo quimioterápico. Sin embargo, durante la administración de oxaliplatino, la ingesta mostró una tendencia a disminuir en ambos grupos, aunque sin alcanzar significancia estadística. Tras la finalización del tratamiento, el consumo de alimento en las hembras tratadas con oxaliplatino resultó significativamente menor a los niveles previos a la quimioterapia (Fig. 33C), lo que podría contribuir a la menor ganancia de peso observada.

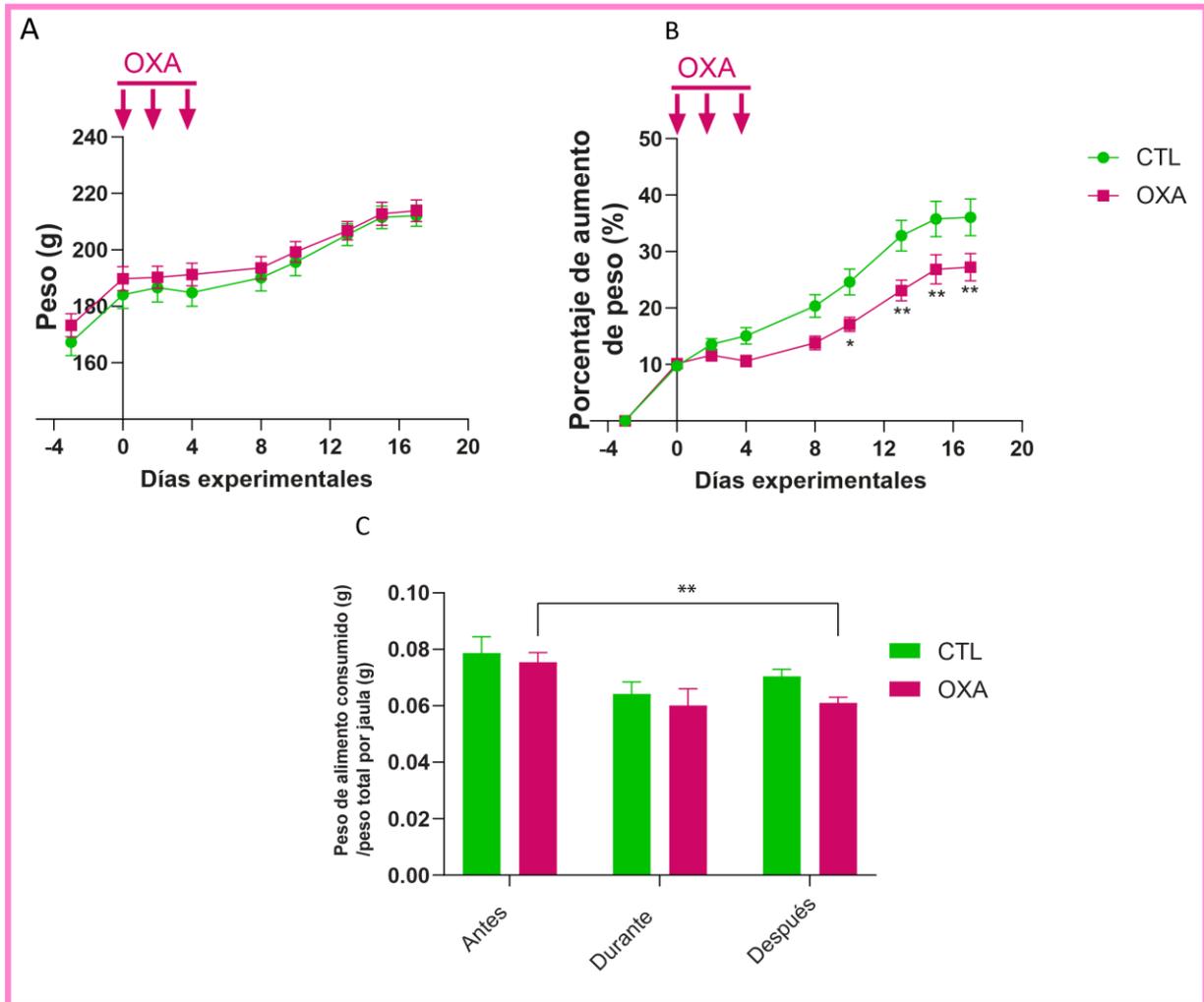


Figura 33. (A) Curva de crecimiento de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. (B) Porcentaje de aumento de peso en función del tiempo. En ambos gráficos las flechas indican el periodo de administración del quimioterápico (OXA) o el vehículo (SF). (C) Consumo de alimento de animales controles y animales expuestos a oxaliplatino, antes, durante y después de la administración del quimioterápico. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test ANOVA de 2 vías de medidas repetitivas seguido por el test de Bonferroni. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas, utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.4 Desarrollo de alodinia mecánica y térmica fría

En forma similar a lo observado en machos (sección 4.2.1), las hembras del grupo control mantuvieron niveles de respuesta basales, constantes a lo largo del tiempo, tanto en la prueba de von Frey (Fig. 34A) como en la de Choi (Fig. 34B). En contraste, el grupo que recibió oxaliplatino mostró una marcada disminución en el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos (Fig. 34A) y un aumento significativo en el número de respuestas positivas frente a la estimulación con acetona (Fig. 34B), que se manifestaron desde el inicio del ciclo quimioterápico y durante todo el período experimental.

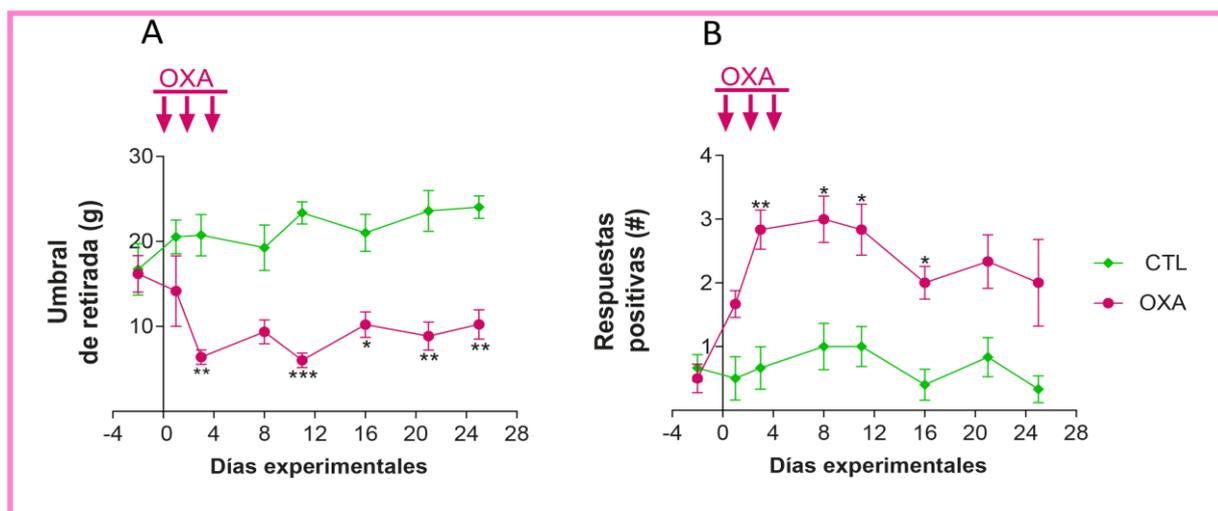


Figura 34. Umbral de retirada de las patas traseras frente a estímulos mecánicos, evaluado con la prueba de von Frey (A) y número de respuestas positivas ante a estímulos térmicos fríos, evaluado mediante la prueba de Choi (B), en ratas hembra. Las flechas indican el periodo de administración del quimioterápico (OXA) o el vehículo (SF). Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas seguido por el test de Bonferroni. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas, utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Al comparar el perfil de respuestas detectadas en ambos sexos, no observamos diferencias significativas entre los grupos control, macho y hembra, en ninguna de las dos pruebas comportamentales (Fig. 35, $p > 0,05$ en todos los casos). De igual forma, los animales de ambos sexos tratados con oxaliplatino presentaron un perfil de respuesta similar, tanto frente a la estimulación mecánica (Fig. 35A) como ante estímulos térmicos fríos (Fig. 35B), sin identificarse diferencias entre machos y hembras ($p > 0.05$ en todos los días experimentales).

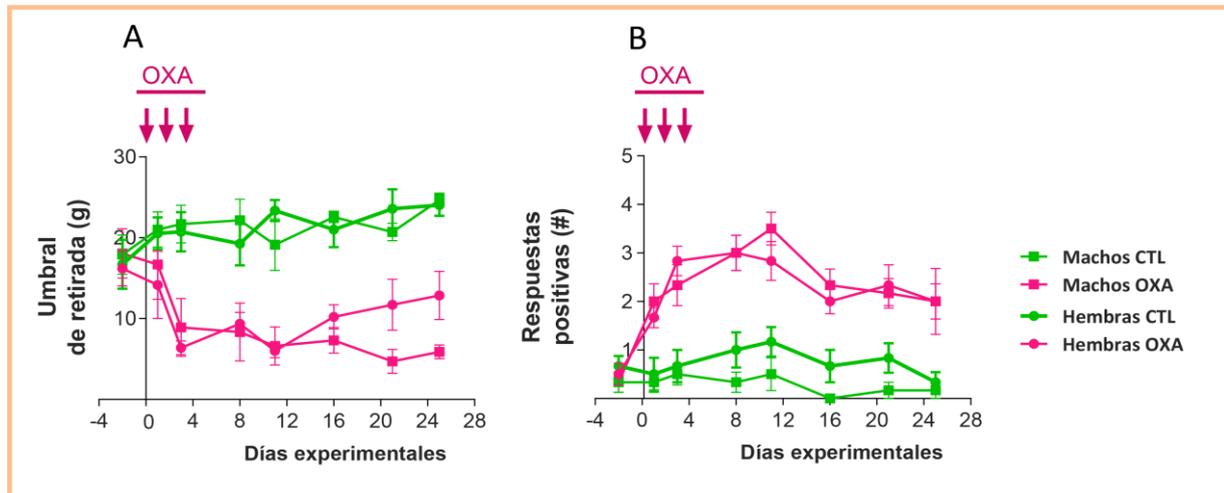


Figura 35. Conducta nociceptiva en ratas macho y hembra: umbral de retirada de las patas traseras frente a estímulos mecánicos, evaluado con la prueba de von Frey (A), y número de respuestas positivas ante a estímulos térmicos fríos, evaluado mediante la prueba de Choi (B). Las flechas indican el periodo de administración del quimioterápico. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas seguido por el test de Tukey para comparar entre sexos. Todas las comparaciones realizadas entre animales de ambos sexos dentro de cada grupo experimental (CTL u OXA) resultaron ser no significativas ($p > 0.05$).

Como se muestra en la figura anterior, al realizar la cuantificación tradicional en la prueba de Choi, no detectamos diferencias entre animales de ambos sexos expuestos al agente antineoplásico. Sin embargo, este resultado contrastaba con el comportamiento observado al llevar a cabo las evaluaciones, con respuestas más intensas o sostenidas en el tiempo en las hembras. Esta discordancia motivó un segundo análisis, descrito en la sección Materiales y Métodos como prueba de Choi modificada, en la que se individualizaban y contabilizaban todas las respuestas positivas manifestadas por el animal durante el minuto posterior a la estimulación. Este análisis reveló un perfil diferencial de respuestas según el sexo: las hembras expuestas a oxaliplatino exhibieron un mayor número de respuestas positivas en comparación con los machos (Fig. 36), indicando una mayor sensibilidad a la estimulación térmica fría. Por su parte, ambos grupos de animales controles, machos y hembras, tuvieron un perfil de respuesta comparable ($p > 0.05$ al comparar entre sexos en todos los días evaluados).

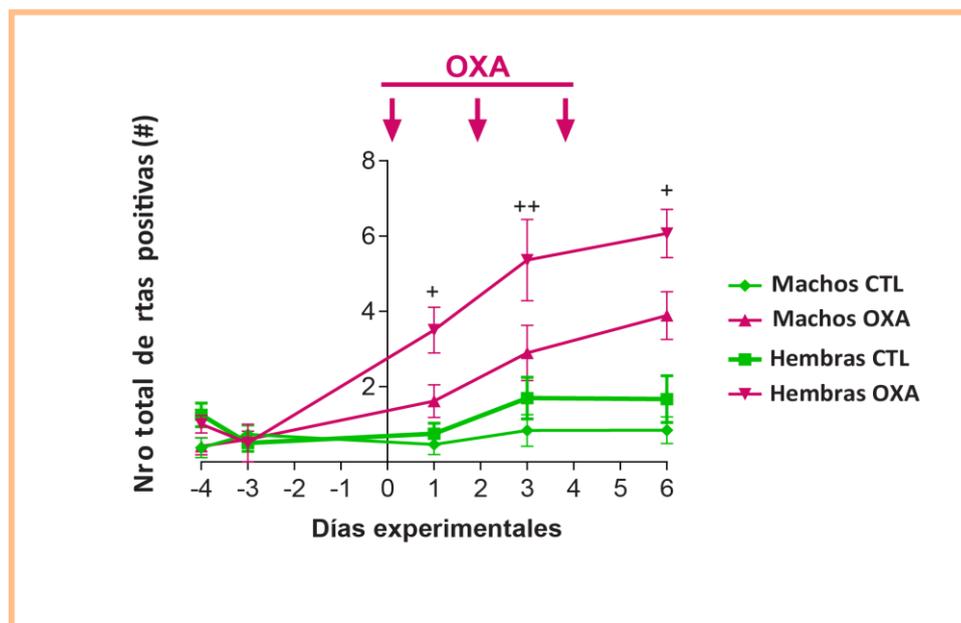


Figura 36. Número de respuestas positivas frente a estímulos térmicos fríos, evaluado mediante la prueba de Choi modificada. Las flechas indican el periodo de administración del quimioterápico. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por el test de Bonferroni. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas detectadas al comparar machos y hembras, dentro de cada grupo experimental: ⁺ $p < 0,05$, ⁺⁺ $p < 0,01$.

4.4 Cambios en la expresión de mediadores clave en la generación de dolor: diferencias asociadas al sexo

4.4.1 Receptores de potencial transitorio

Tal como se detalló en la sección anterior, tras la administración de oxaliplatino, las ratas hembra desarrollaron una mayor sensibilidad al frío en comparación con los machos. A partir de este hallazgo, se decidió evaluar la expresión del receptor TRPM8, implicado en la detección de estímulos fríos inocuos, en los ganglios de animales de ambos sexos. Asimismo, se analizó la expresión de otros miembros de la familia TRP, específicamente TRPA1 (activado por frío nocivo) y TRPV1 (activado por calor nocivo). Dado que estos canales iónicos también han sido asociados con la modulación de la excitabilidad de los circuitos nociceptivos espinales, se examinó su expresión a nivel medular. Estas evaluaciones se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real en tejidos recolectados 10 días después de iniciar la quimioterapia.

En primer lugar, analizamos los niveles del ARNm que codifica para TRPM8, canal iónico activado por frío no nocivo como el generado mediante la estimulación con acetona. Luego de la administración de oxaliplatino se observó un aumento en los niveles de expresión de TRPM8, tanto en machos (Fig. 37A,D) como en hembras (Fig. 37B,E), y en ambos tejidos, ganglios (Fig. 37A,B) y médula (Fig. 37D,E). Sin embargo, mientras que en la médula no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos (Fig. 37C), en los ganglios de hembras los niveles del ARNm de TRPM8 fueron significativamente mayores (Fig. 37F).

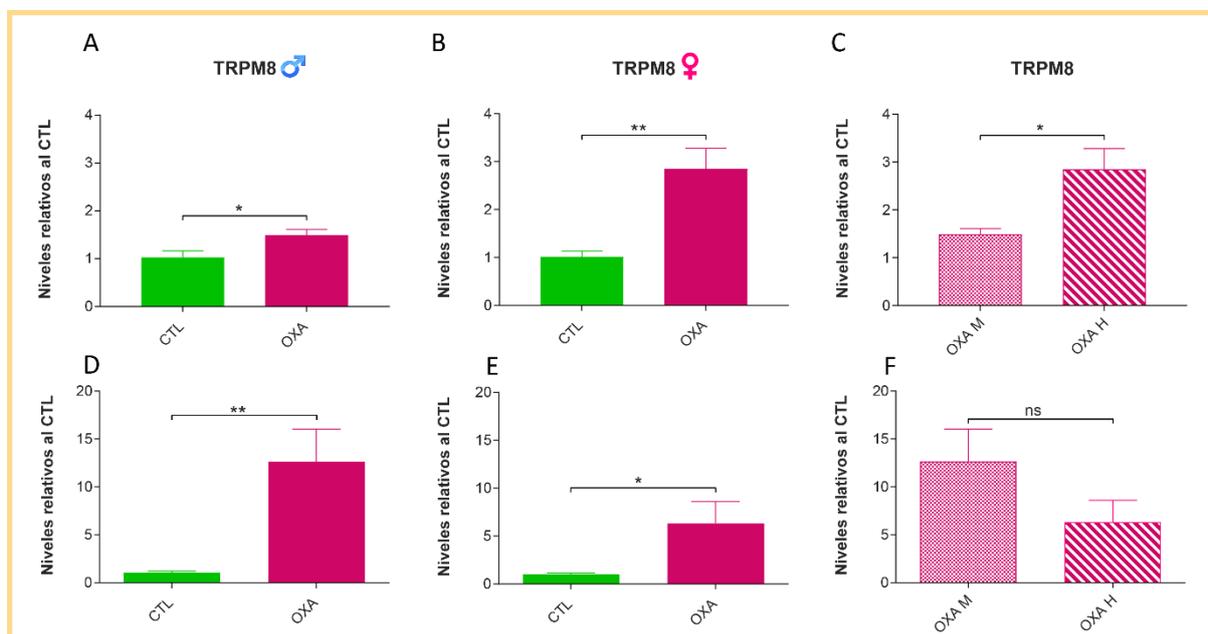


Figura 37. Niveles de expresión de TRPM8 en los ganglios raquídeos L4-6 (A-C) y en la médula espinal lumbar (D-F) de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Interesantemente, estos hallazgos coinciden con nuestras observaciones en los estudios comportamentales que mostraron una mayor sensibilidad de las hembras a estímulos térmicos fríos.

También analizamos los niveles de expresión del receptor TRPA1, canal iónico activado por frío nocivo. Observamos un incremento significativo en los ganglios raquídeos lumbares de animales expuestos a oxaliplatino, tanto machos (Fig. 38A) como hembras (Fig. 38B). Si bien la magnitud del aumento fue mayor en machos, no llegamos a detectar una diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles del mensajero en ambos sexos (Fig. 38C). Por su parte, en la médula espinal, la expresión de TRPA1 permaneció sin cambios luego de la exposición al quimioterápico en machos (Fig. 38D) y en hembras (Fig. 38E), y sin diferencias entre sexos (Fig. 38F).

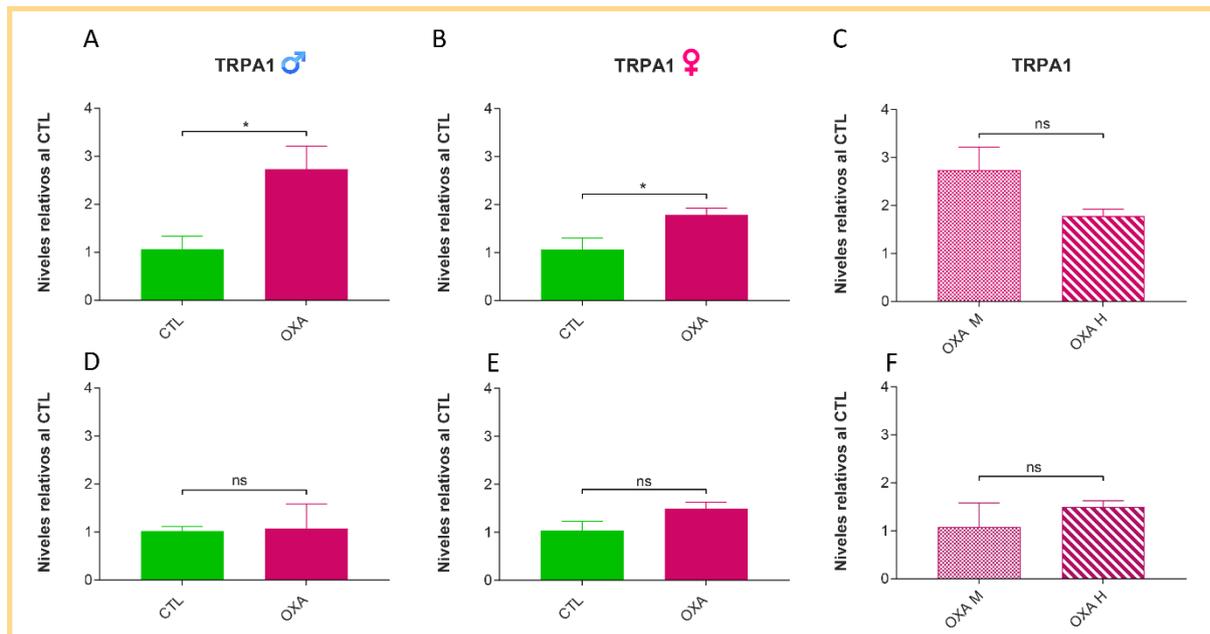


Figura 38. Niveles de expresión de TRPA1 en los ganglios raquídeos L4-6 (A-C) y la médula espinal lumbar (D-F) de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (* $p < 0,05$).

Por último, evaluamos la expresión del receptor TRPV1, activado por temperaturas superiores a los 43°C, en el rango de calor nocivo, y también involucrado en la generación de hipersensibilidad mecánica. En este caso, detectamos un incremento en la expresión de TRPV1 tanto en los ganglios (Fig. 39A,B) como en la médula espinal (Fig. 39D,E) de los animales expuestos a oxaliplatino. Esta sobre-expresión de detectó en machos (Fig. 39A,D) y hembras (Fig. 39B,E), sin observarse diferencias asociadas al sexo a nivel del SNP (Fig. 39C) o SNC (Fig. 39F).

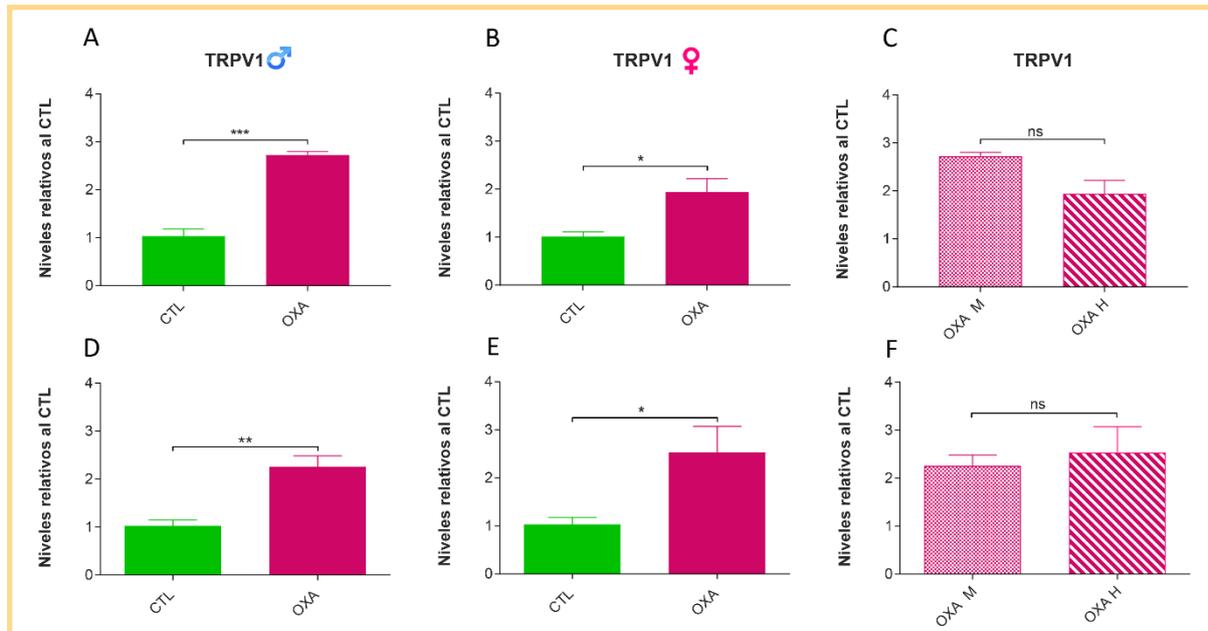


Figura 39. Niveles de expresión de TRPV1 en los ganglios raquídeos L4-6 (A-C) y en la médula espinal lumbar (D-F) de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.4.2 Receptores cannabinoides y sus ligandos endógenos, los endocannabinoides

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema endógeno con un rol clave en la modulación del dolor. Los principales endocannabinoides, AEA y 2AG, además de ejercer acciones analgésicas y anti-inflamatorias a través de la interacción con los receptores CB1 y CB2, actúan como moduladores alostéricos de los canales TRPs, participando en la regulación de la respuesta ante estímulos externos. En base a estos antecedentes y a nuestros propios resultados detallados en las secciones anteriores, decidimos evaluar los niveles de los endocannabinoides y los receptores CB1 y CB2 en los ganglios raquídeos y la médula espinal de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino.

La evaluación de los niveles de los endocannabinoides mediante ELISA reveló que las concentraciones basales de 2AG (en el orden de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) eran superiores a las de AEA (del orden de ng/mg de proteína) tanto en los ganglios de la raíz dorsal como en la médula espinal de machos y hembras (Tabla 4), en concordancia con lo reportado en otras regiones del sistema nervioso. Además, en los ganglios de animales controles de ambos sexos se detectaron concentraciones más elevadas de ambos endocannabinoides en comparación con la médula espinal (Tabla 4). En ambos tejidos, los niveles basales de 2AG y AEA fueron similares en machos y hembras (Tabla 4, $p > 0.05$).

Tejidos	2AG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)	AEA (ng/mg de proteína)
Ganglios de machos	$16,77 \pm 1,42$	$24,40 \pm 0,80$
Ganglios de hembras	$13,3 \pm 1,82$	$26,7 \pm 3,23$
Médula de machos	$6,04 \pm 0,59$	$19,80 \pm 2,54$
Médula de hembras	$4,42 \pm 0,64$	$12,68 \pm 0,84$

Tabla 4. Concentraciones de los endocannabinoides 2AG y AEA en los ganglios raquídeos y la médula espinal lumbar de animales controles de ambos sexos. Se incluyeron 6 muestras por grupo experimental. Valores expresados como media \pm SEM.

Tras la administración de oxaliplatino, se observó una reducción en los niveles de 2AG en los ganglios de machos (Fig. 40A), mientras que en las hembras no se detectaron cambios (Fig. 40B). Al comparar los niveles de 2AG en los ganglios de animales de ambos sexos expuestos a oxaliplatino, no observamos diferencias significativas (Fig. 40C).

Además, la administración del quimioterápico indujo una reducción en los niveles de AEA en los ganglios de ratas hembra (Fig. 40E), mientras que en los machos no se detectaron cambios (Fig. 40D). Al comparar los niveles de anandamida en los ganglios de animales de ambos sexos expuestos a oxaliplatino, observamos niveles significativamente mayores en machos (Fig. 40F).

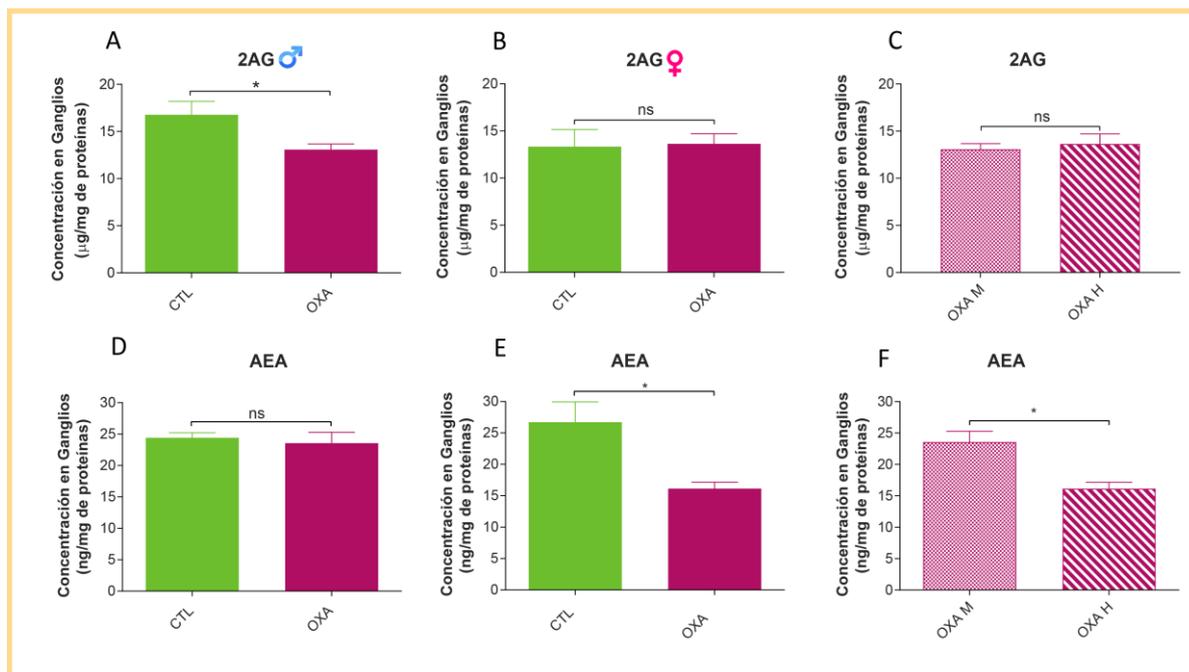


Figura 40. Niveles de 2AG (A-C) y AEA (D-F) en los ganglios raquídeos lumbares de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 6 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (* $p < 0,05$,).

Por su parte, en la médula espinal, no se detectaron cambios en las concentraciones de 2AG y AEA que mantuvieron valores similares a los detectados en animales controles (datos no mostrados, $p > 0,05$ para CTL vs OXA en ambos sexos, tanto para 2AG como para AEA).

Cuando evaluamos la expresión de los receptores cannabinoides en los ganglios raquídeos, observamos un aumento significativo en los niveles de ARNm correspondientes tanto a CB1 como a CB2 en ratas macho (Fig. 41 A,D) y hembra (Fig. 41B,E), 10 días después de iniciar el ciclo de quimioterapia. La magnitud del incremento en las hembras fue casi el doble que en los machos: en los animales tratados con oxaliplatino, los niveles de ARNm de CB1 aumentaron un $68 \pm 19\%$ en machos (Fig. 41A), mientras que en hembras el incremento fue del $142 \pm 41\%$ (Fig. 41B). De manera similar, los niveles de ARNm de CB2 aumentaron un $70 \pm 21\%$ en machos (Fig. 41D) y un $139 \pm 41\%$ (Fig. 41E) en hembras tras la administración de oxaliplatino. Sin embargo, al comparar los niveles de CB1 y CB2 en los ganglios de animales OXA de ambos sexos, no se detectaron diferencias significativas (Fig. 41C,F).

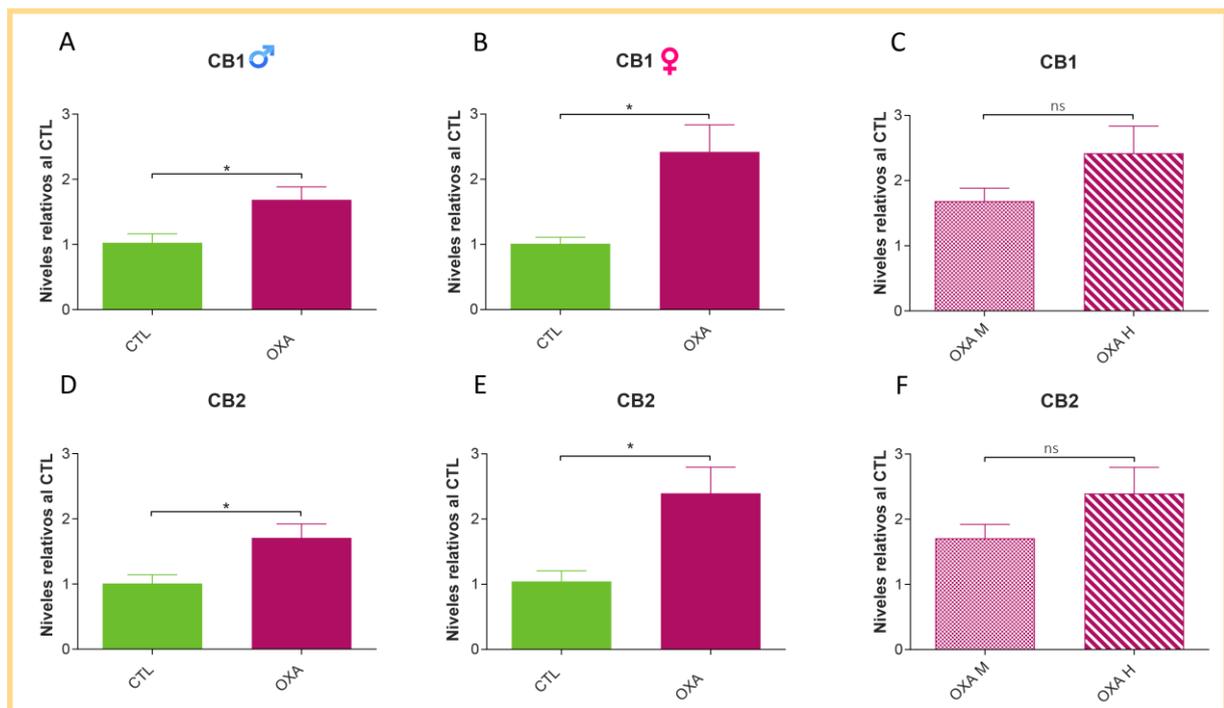


Figura 41. Niveles de expresión de CB1 (A-C) y CB2 (D-F) en los ganglios raquídeos lumbares de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$).

Finalmente, no observamos cambios en los niveles de expresión de CB1 y CB2 en la médula espinal de animales de ambos sexos, detectándose valores similares a los de animales controles (datos no mostrados, $p > 0,05$ para CTL vs OXA en ambos sexos, tanto para 2AG como para AEA).

En su conjunto, nuestros hallazgos muestran la adaptación del sistema endocannabinoide luego de la exposición a oxaliplatino, involucrando específicamente a estructuras del SNP y presentando ciertas características diferenciales según el sexo.

4.4.3 Marcadores de daño neuronal y activación glial

Al evaluar marcadores relacionados con estrés y daño celular en los ganglios raquídeos de animales de ambos sexos, observamos un aumento significativo en los niveles del factor de transcripción ATF3 tanto en machos (Fig. 42A) como en hembras (Fig. 42B). No se identificaron diferencias asociadas al sexo (Fig. 42C). Por otra parte, mientras que en los ganglios de machos detectamos un incremento significativo en los niveles de HMGB1 (Fig. 42D), en los ganglios de hembras no se evidenciaron cambios (Fig. 42E). Los niveles de expresión de HMGB1 resultaron significativamente mayores en machos (Fig. 42F).

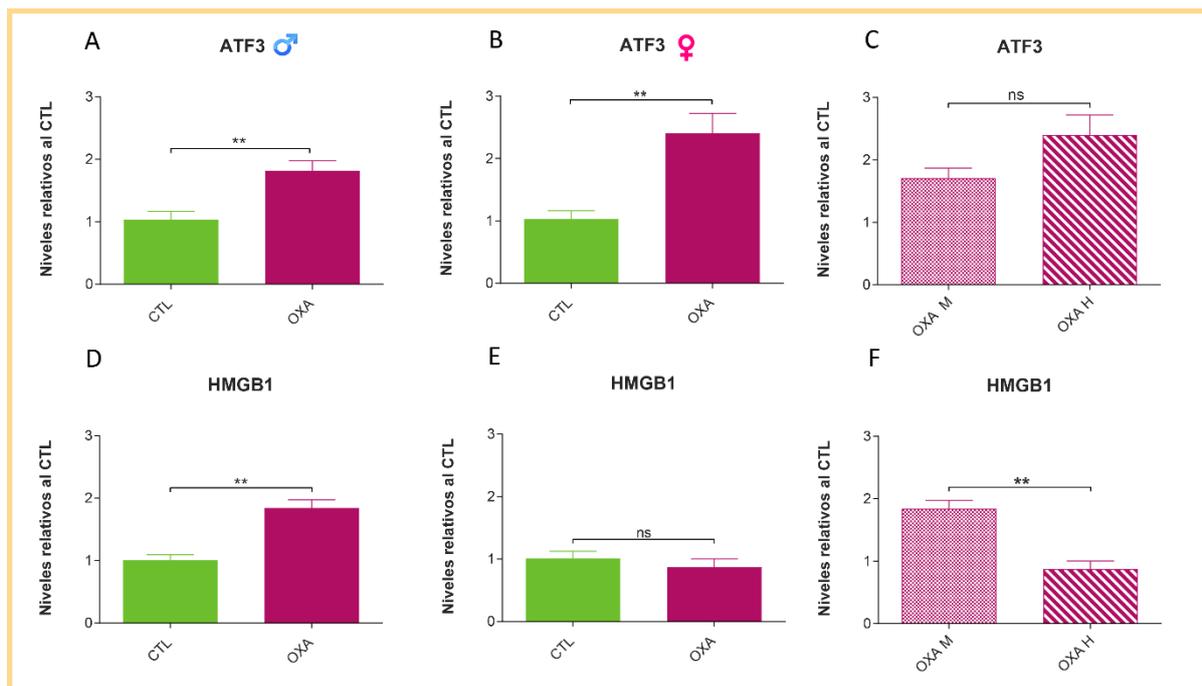


Figura 42. Niveles de expresión de ATF3 (A-C) y HMGB1 (D-F) en los ganglios raquídeos lumbares de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (*ns* $p > 0,05$, ** $p < 0,01$)

También analizamos los niveles de expresión de GFAP (Fig. 43A-C) e IBA-1 (Fig. 43D-F) en los ganglios de animales de ambos sexos. Tanto en machos como en hembras detectamos un incremento significativo de ambos marcadores (Fig. 33A,D para machos, Fig. 43B,E para hembras). Este aumento inducido por oxaliplatino presentó dimorfismo sexual, ya que el incremento en los niveles del ARNm de GFAP fue significativamente mayor en machos (Fig. 43C), mientras que en hembras se observó un mayor aumento del marcador IBA-1 (Fig. 43F).

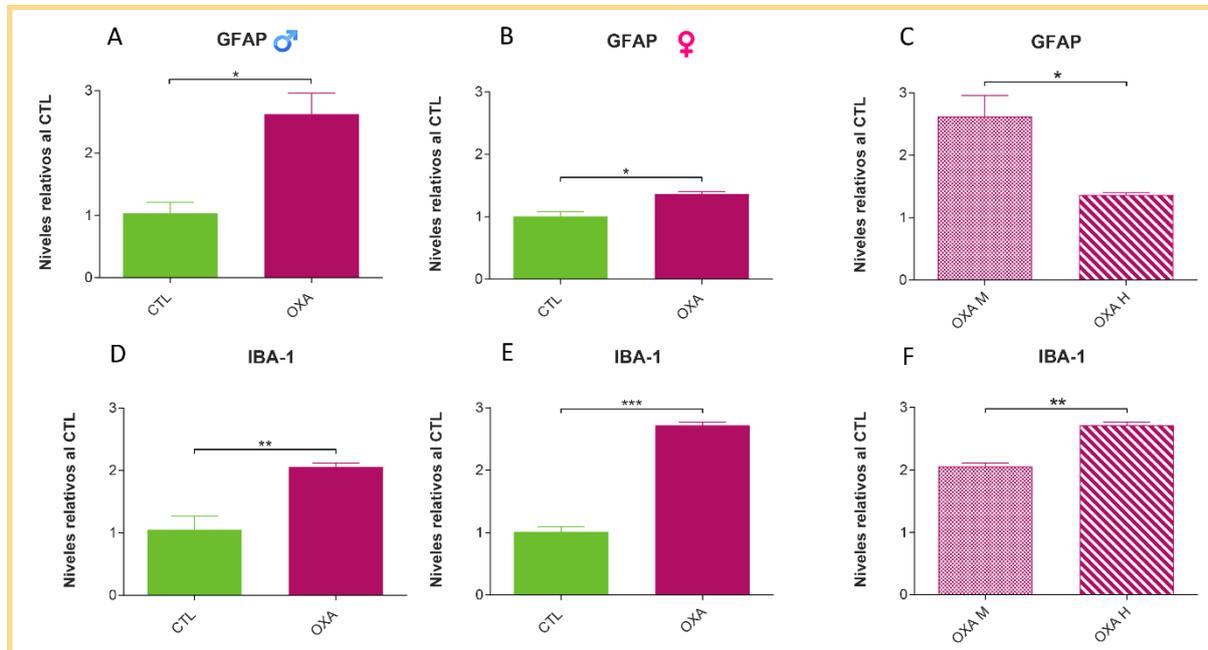


Figura 43. Niveles de expresión de GFAP (A-C) e IBA-1 (D-F) en los ganglios raquídeos lumbares de animales de ambos sexos, controles y expuestos a oxaliplatino. En (A, D) se muestran los resultados obtenidos en machos; en (B, E) los resultados obtenidos en hembras, y en (C, F) el análisis comparativo entre ambos sexos. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos representados corresponden a la media \pm SEM y se analizaron usando el test de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Estos hallazgos sugieren que la exposición a oxaliplatino induce daño de las neuronas aferentes primarias, activación de células satelitales e infiltración macrófaga en ganglios de animales de ambos sexos. Llamativamente, los cambios funcionales de las células satelitales parecieran ser más marcados en machos, mientras que la infiltración macrófaga pareciera ser mayor en hembras.

Finalmente, analizamos la expresión proteica y localización tisular de GFAP en secciones de ganglios, y de GFAP e IBA-1 en secciones de médula de ratas hembra, mediante inmunofluorescencia.

En forma similar a lo detectado en machos (sección 4.1.3), en los ganglios raquídeos de ratas hembra expuestas a oxaliplatino, identificamos un aumento en la inmunoreactividad para GFAP (Fig. 44A). Mientras que en los ganglios de animales controles la señal inmunoreactiva fue tenue (Fig. 44A, panel superior), en los de animales expuestos al quimioterápico se observó marcación intensa de las células satélite, localizadas rodeando los cuerpos neuronales (Fig. 44A, panel inferior). En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcados con el colorante DAPI (fluorescencia azul), que muestran la disposición perineuronal de las células satelitales.

Al cuantificar la intensidad de fluorescencia por unidad de área, detectamos un incremento significativo en los animales del grupo oxaliplatino en comparación con el grupo control (Fig. 44B). Estos hallazgos concuerdan con los resultados previamente obtenidos en machos, indicando que las células satelitales del ganglio se activan y sufren modificaciones funcionales en ambos sexos, luego de la exposición al quimioterápico.

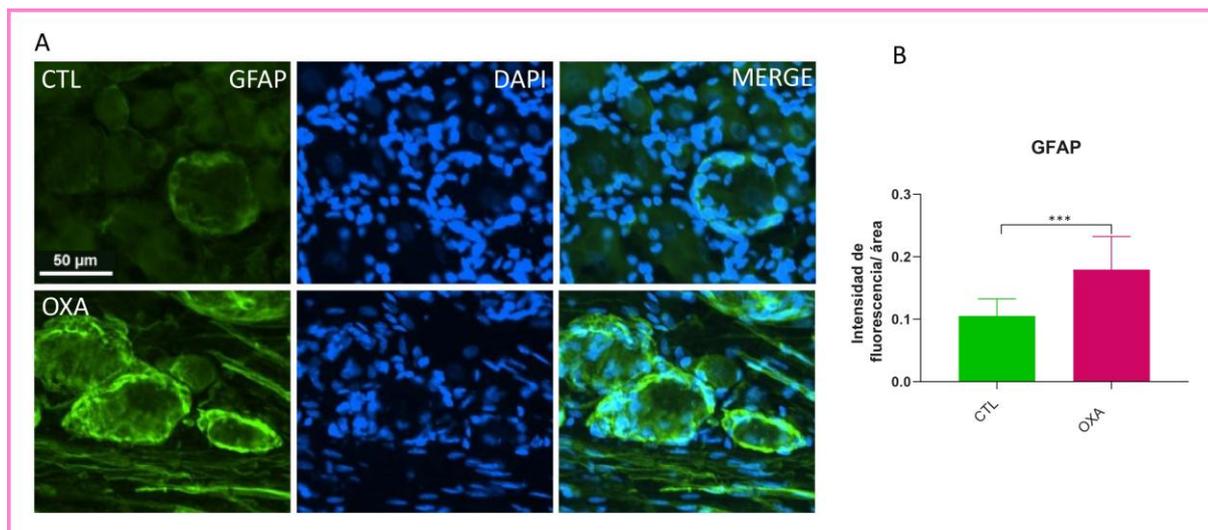


Figura 44. Fotografías representativas de la señal inmunoreactiva para GFAP en los ganglios anexos a la raíz dorsal L4-6 de ratas hembra (A). En el panel superior se muestran fotografías de ganglios controles, mientras que en el panel inferior se muestran las correspondientes a animales tratados con oxaliplatino. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcados con el colorante DAPI (fluorescencia azul). Intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales (B). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (***) $p < 0.001$.

Por su parte, en las secciones de la médula espinal lumbar de ratas hembra también observamos un incremento en la inmunomarcación para GFAP (Fig. 45). Este aumento en la señal inmunoreactiva se localizó en el asta dorsal, lo que sugiere que, al igual que en machos (sección 4.1.3), la administración de oxaliplatino indujo la activación de astrocitos en regiones clave para el procesamiento de la información nociceptiva. En las imágenes (Fig. 45A,B) puede observarse el mayor tamaño del soma celular y el mayor número de prolongaciones que presentan los astrocitos en la médula de animales del grupo OXA.

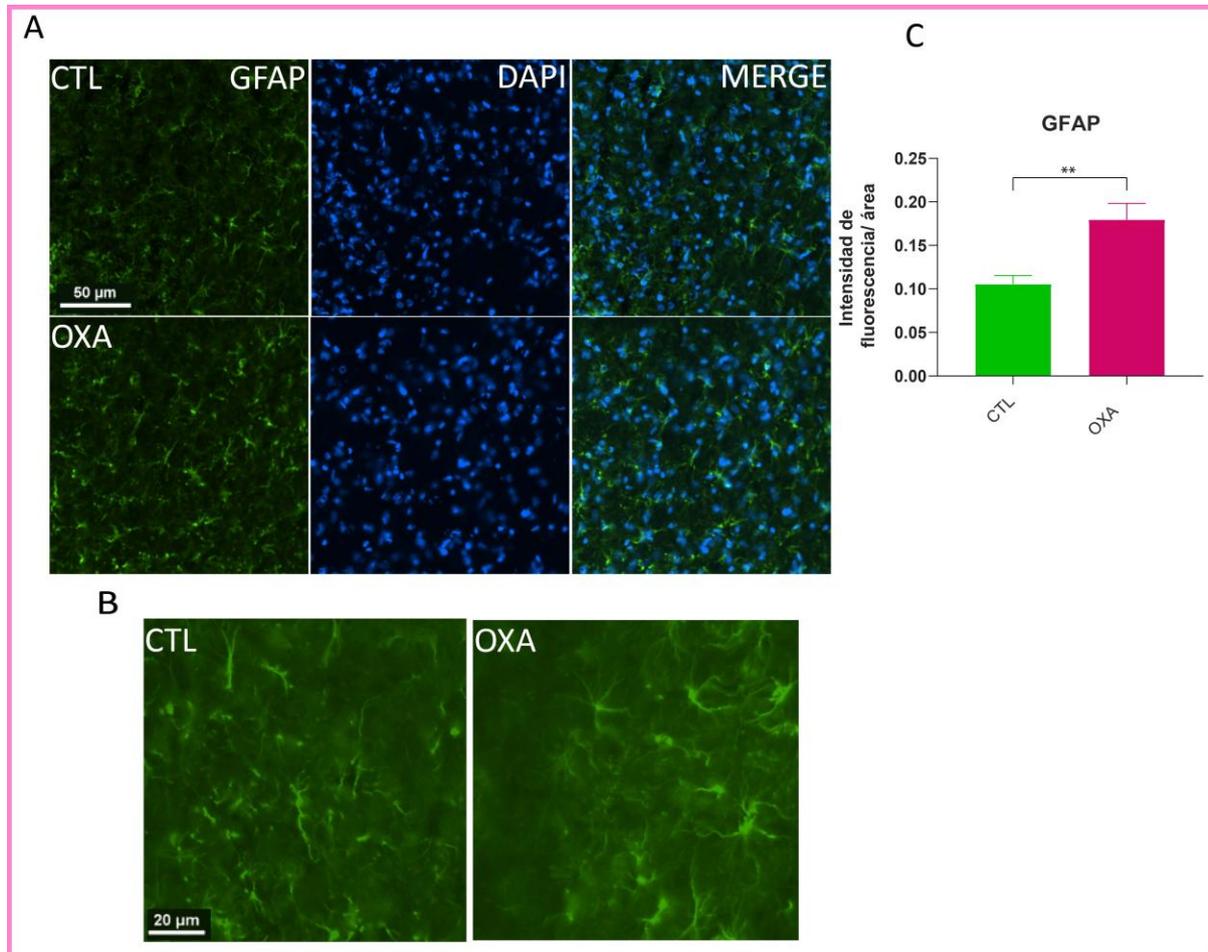


Figura 45. Fotografías representativas de la señal inmunoreactiva para GFAP en la médula espinal lumbar de ratas hembra (A). En el panel superior se muestran fotografías de secciones de ganglios controles, mientras que en el panel inferior se muestran las correspondientes a secciones obtenidas a partir de animales tratados con oxaliplatino. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcador con el colorante DAPI (fluorescencia azul). En (B) se muestran imágenes a mayor aumento que permiten apreciar la morfología de las células marcadas, y en (C) se grafica la intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales. Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados el test de Student (** $p < 0.01$).

Finalmente, cuando evaluamos la inmunoreactividad para IBA-1 no detectamos cambio alguno en secciones de médula espinal de ratas hembra expuestas a oxaliplatino, en relación con animales controles (Fig. 46). Tanto la morfología de las células con somas pequeños y prolongaciones delgadas (Fig. 46A,B) como la intensidad de la señal fluorescente (Fig. 46C) fue similar en animales controles e inyectados con oxaliplatino. De este modo, la microglía espinal no pareciera verse sustancialmente afectada por el tratamiento con oxaliplatino en ratas hembra. Este resultado difiere de lo observado en machos (sección 4.1.3) donde detectamos un marcado incremento en la señal inmunoreactiva para IBA-1, sugiriendo que los efectos de la administración del quimioterápico sobre el proceso de activación microglial a nivel espinal presenta características específicas según el sexo.

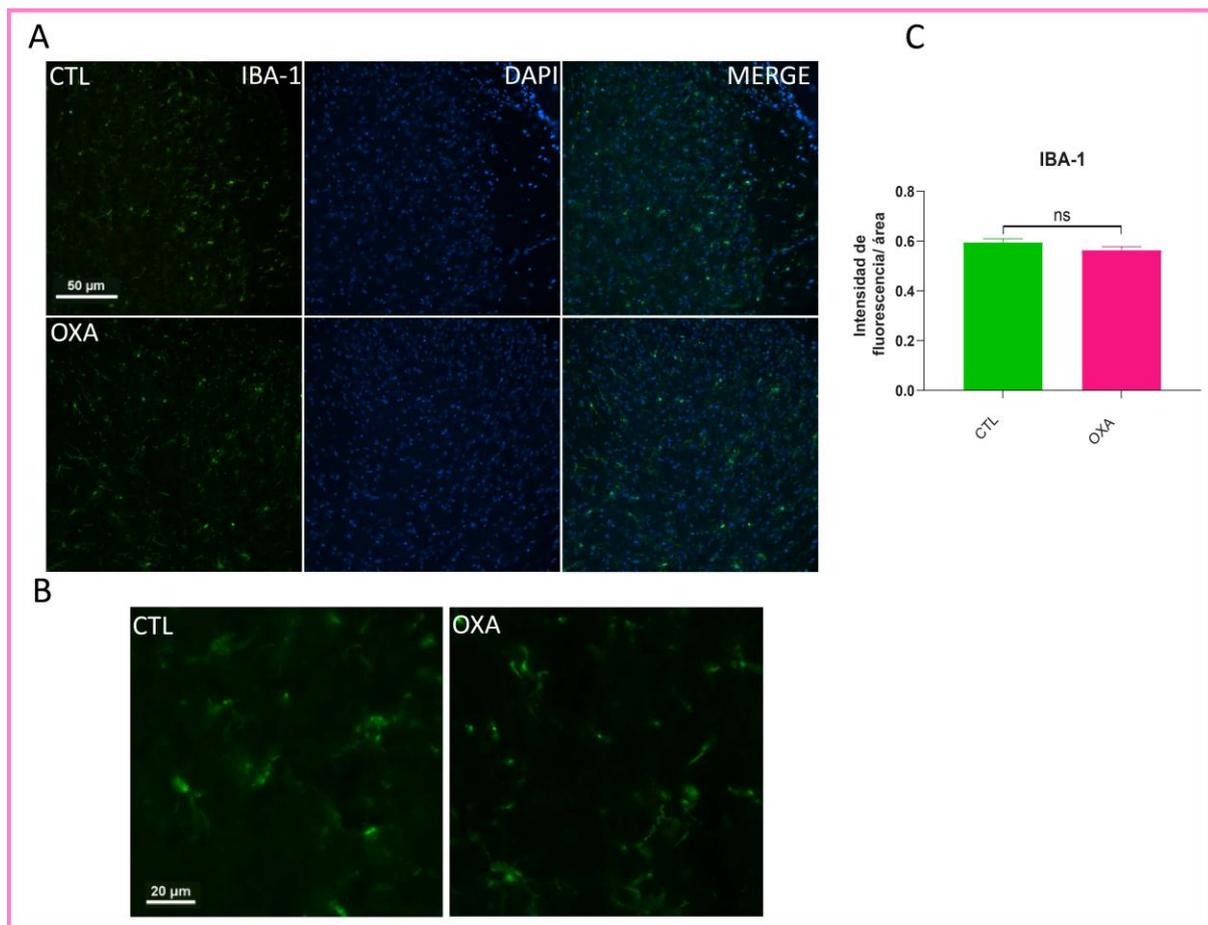


Figura 46. Fotografías representativas de la señal inmunoreactiva para IBA-1 en la médula espinal lumbar (A). En el panel superior se muestran fotografías de secciones de ganglios controles, mientras que en el panel inferior se muestran las correspondientes a secciones obtenidas a partir de animales tratados con oxaliplatino. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcador con el colorante DAPI (fluorescencia azul). En (B) se muestran imágenes a mayor aumento que permiten apreciar la morfología de las células marcadas, y en (C) se grafica la intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales. Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (ns $p > 0,05$).

Proyecto III

A partir de los hallazgos del Proyecto I, que mostraron la inducción de estrés oxidativo, daño neuronal y procesos neuroinflamatorios luego de la exposición a oxaliplatino, en este nuevo proyecto nos propusimos evaluar los efectos del resveratrol, un polifenol natural conocido por sus propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y anti-inflamatorias. Los estudios se realizaron en ratas macho divididas en grupos que recibieron oxaliplatino, oxaliplatino combinado con resveratrol, o los vehículos correspondientes (animales controles). El resveratrol se administró siguiendo un esquema terapéutico (RESVt), que comenzó una vez finalizada la administración del quimioterápico y establecida la hipersensibilidad / alodinia, o un esquema preventivo (RESVp) que comenzó antes de iniciar el esquema quimioterápico y se mantuvo a lo largo de todo el período experimental. Inicialmente, se analizaron los efectos conductuales del polifenol en protocolos de largo plazo y, posteriormente, sus efectos moleculares en tejidos recolectados 10 días después del inicio del esquema quimioterápico, en protocolos de corto plazo, como se muestra en la figura 10A de Materiales y Métodos.

4.5 Efectos de la administración terapéutica de resveratrol sobre las alteraciones comportamentales desencadenadas por oxaliplatino

En primer lugar, evaluamos si la administración de resveratrol lograba revertir la hipersensibilidad y la alodinia inducidas por oxaliplatino. Para ello, los animales expuestos al quimioterápico recibieron resveratrol o vehículo en esquema terapéutico, es decir, una vez establecida la disminución del umbral mecánico y térmico, a partir del día 7 del período experimental.

Al evaluar el perfil de respuesta de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, detectamos que al igual que los animales OXA, aquellos que recibieron OXA+RESVt mostraron una disminución en el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos (Fig. 47A) y un aumento en el número de respuestas positivas frente a la estimulación con acetona (Fig. 47B). Si bien en el test de von Frey los animales tratados con oxaliplatino y resveratrol mostraron un umbral de retirada levemente superior al observado en aquellos que recibieron únicamente oxaliplatino, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos experimentales evaluados ($p > 0.05$ en todos los casos). Esta ausencia de diferencias significativas se mantuvo tanto en el test de von Frey como en el test de Choi. Estos resultados indican que en las condiciones experimentales utilizadas la administración tardía de resveratrol no logró revertir la alodinia mecánica ni la alodinia térmica fría inducidas por el antineoplásico.

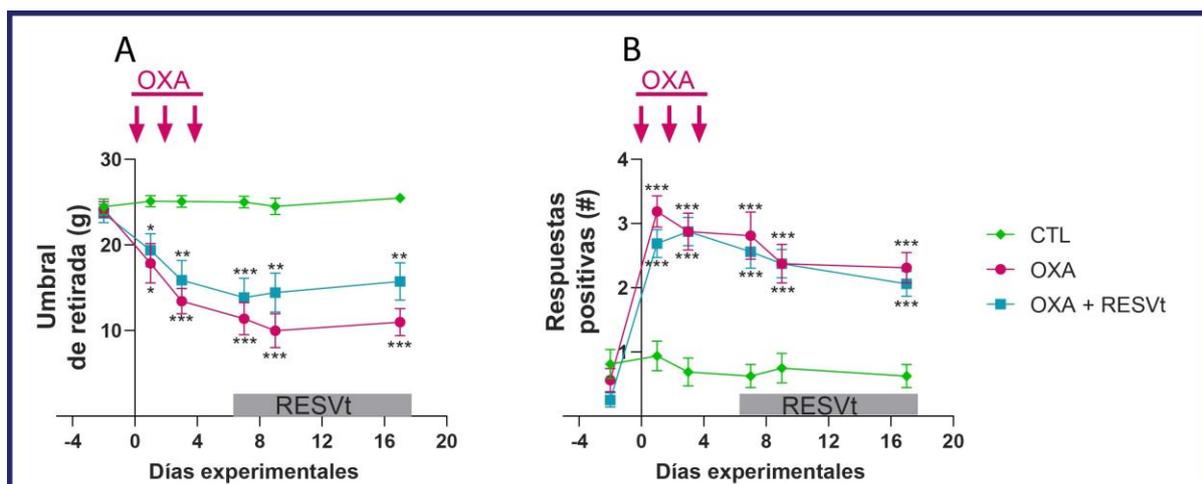


Figura 47. Umbral de retirada frente a estímulos mecánicos, evaluado con el test de von Frey (A) y número de respuestas positivas frente a estímulos térmicos fríos, evaluado con el test de Choi (B). El área sombreada indica el período de administración de resveratrol, y las flechas señalan el momento de las inyecciones de oxaliplatino. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas, seguido por el test de Bonferroni. Se utilizaron los siguientes símbolos para representar las diferencias estadísticamente significativas identificada al comparar OXA vs CTL y OXA+RESVt vs CTL: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.6 Efectos de la administración preventiva de resveratrol sobre los cambios conductuales desencadenados por oxaliplatino

4.6.1 Prevención de alodinia mecánica y térmica fría

Dado que la administración tardía de resveratrol no logró revertir la alodinia ya establecida, nos propusimos evaluar si su administración temprana era capaz de prevenir su desarrollo. Para ello, el tratamiento con resveratrol se inició previo al inicio de la quimioterapia y se mantuvo durante y después de finalizada la misma, siguiendo un esquema preventivo y sostenido en el tiempo.

Al evaluar la respuesta frente a la estimulación mecánica se observó que, mientras que los animales OXA mostraron una disminución significativa en el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos (Fig. 48A), el grupo que recibió OXA+RESVp mantuvo un perfil de respuesta similar al grupo CTL (Fig. 48A, $p > 0,05$ en todos los casos). En forma similar, mientras que en los animales OXA se detectó un incremento significativo en el número de respuestas positivas frente a la estimulación térmica fría (Fig. 48B), aquellos que recibieron el polifenol mostraron un perfil de respuesta similar al de los animales controles (Fig. 48B, $p > 0,05$ en todos los casos). No se observaron diferencias significativas entre los animales OXA+RESVp y los animales CTL en ninguno de los tiempos experimentales evaluados ($p > 0,05$ en todos los casos). Estos resultados indican que la administración temprana y sostenida de resveratrol logró prevenir la alodinia mecánica y térmica fría.

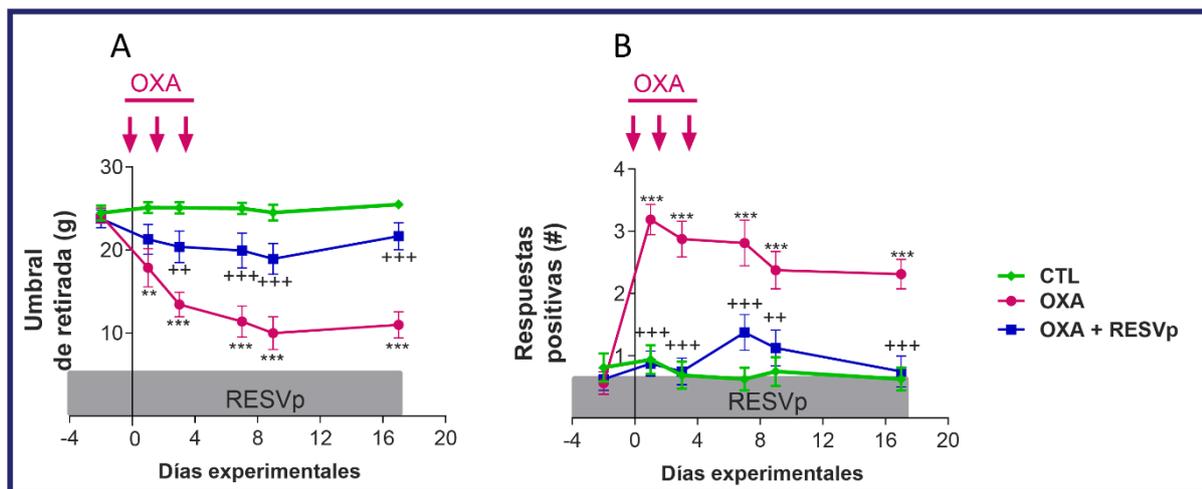


Figura 48. Umbral de retirada frente a estímulos mecánicos, evaluado con el test de von Frey (A) y número de respuestas positivas frente a estímulos térmicos fríos, evaluado con el test de Choi (B). El área sombreada indica el período de administración de resveratrol, y las flechas señalan el momento de las inyecciones de oxaliplatino. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas, seguido por el test de Bonferroni. Se utilizaron los siguientes símbolos para representar las diferencias estadísticamente significativas identificada al comparar OXA vs CTL: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; y OXA vs OXA+RESVp: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dado que la administración temprana y sostenida de resveratrol demostró ser eficaz para prevenir la alodinia, decidimos investigar si también era capaz de contrarrestar la atenuación en el crecimiento observada en animales expuestos a oxaliplatino. Adicionalmente, evaluamos si el resveratrol generaba algún impacto en las conductas asociadas con indicadores de dolor espontáneo y en los parámetros relacionados con la locomoción.

4.6.2 Ausencia de efectos sobre indicadores de dolor espontáneo

En ninguno de los grupos experimentales, incluyendo aquellos animales que recibieron tanto oxaliplatino como resveratrol, se observaron cambios en el pelaje como falta de limpieza o presencia de placas alopecias, ni tampoco posturas antálgicas como la retracción de los miembros o actitudes de guardado.

4.6.3 Atenuación de los cambios de peso y consumo de alimento

Al analizar los cambios en el peso corporal, se observó que los animales del grupo CTL mostraron un crecimiento sostenido y casi lineal a lo largo del período experimental (Fig. 49A). En contraste, los animales tratados con OXA presentaron una progresiva atenuación en el crecimiento (Fig. 49A), evidente desde el inicio del tratamiento con quimioterapia y mantida a largo plazo. Los animales que recibieron OXA+RESVp mostraron una curva de crecimiento similar a la del grupo CTL (Fig. 49A, $p > 0,05$ en todos los tiempos evaluados), lo que sugiere un efecto protector del resveratrol frente al impacto del oxaliplatino en la curva de crecimiento corporal.

Al analizar el consumo de alimento, no detectamos diferencias entre los grupos experimentales en ninguno de los períodos evaluados (Fig. 49B, $p > 0,05$ en todos los casos). Sin embargo, sí observamos cambios en función del tiempo. Como ya habíamos mostrado previamente (sección 4.2.3), en el grupo CTL el consumo de alimento se redujo significativamente durante el período en que se realizaron las inyecciones. En el grupo OXA, se evidenció una reducción en el consumo tanto durante como después del ciclo quimioterápico. Y en el grupo OXA+RESVp se identificó un comportamiento similar: menor consumo de alimento durante y después de la quimioterapia.

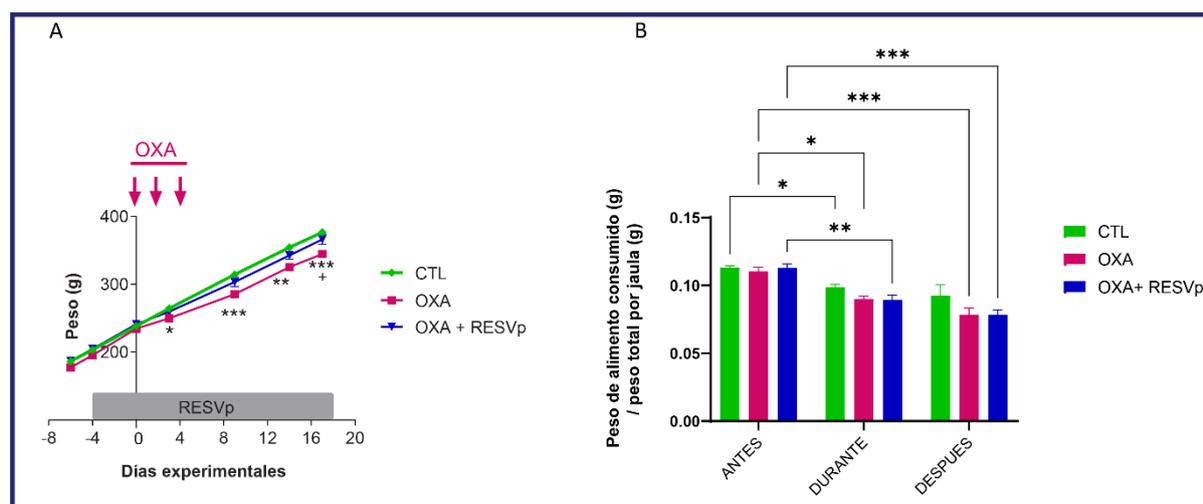


Figura 49. Curvas de crecimiento de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. El área sombreada indica el período de administración oral de resveratrol, y las flechas señalan el momento de las inyecciones de oxaliplatino. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías de medidas repetitivas y la prueba post hoc de Bonferroni. Sólo se muestran en los gráficos las diferencias estadísticamente significativas. Los siguientes símbolos se utilizaron para representar los valores de p : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ al comparar OXA vs CTL, y + $p < 0,05$ al comparar OXA+RESVp vs OXA.

Estos hallazgos sugieren que los efectos beneficiosos del resveratrol sobre el crecimiento corporal no estarían mediados por una mayor ingesta.

4.6.4 Efectos sobre parámetros de locomoción

Al analizar si el resveratrol modulaba parámetros asociados a locomoción, no observamos diferencias en la distancia recorrida (Fig. 50A), la velocidad promedio (Fig. 50B) y el tiempo de inmovilidad (Fig. 50C) al comprar animales de los grupos CTL, OXA y OXA+RESVp, en ninguno de los períodos de tiempo evaluados: antes, durante y después de la administración del quimioterápico. Al hacer el análisis en función del tiempo observamos una disminución de la distancia recorrida por el grupo OXA (Fig. 50A) y una disminución de la velocidad promedio del grupo OXA+RESVp (Fig. 50B), sin detectarse otras diferencias significativas.

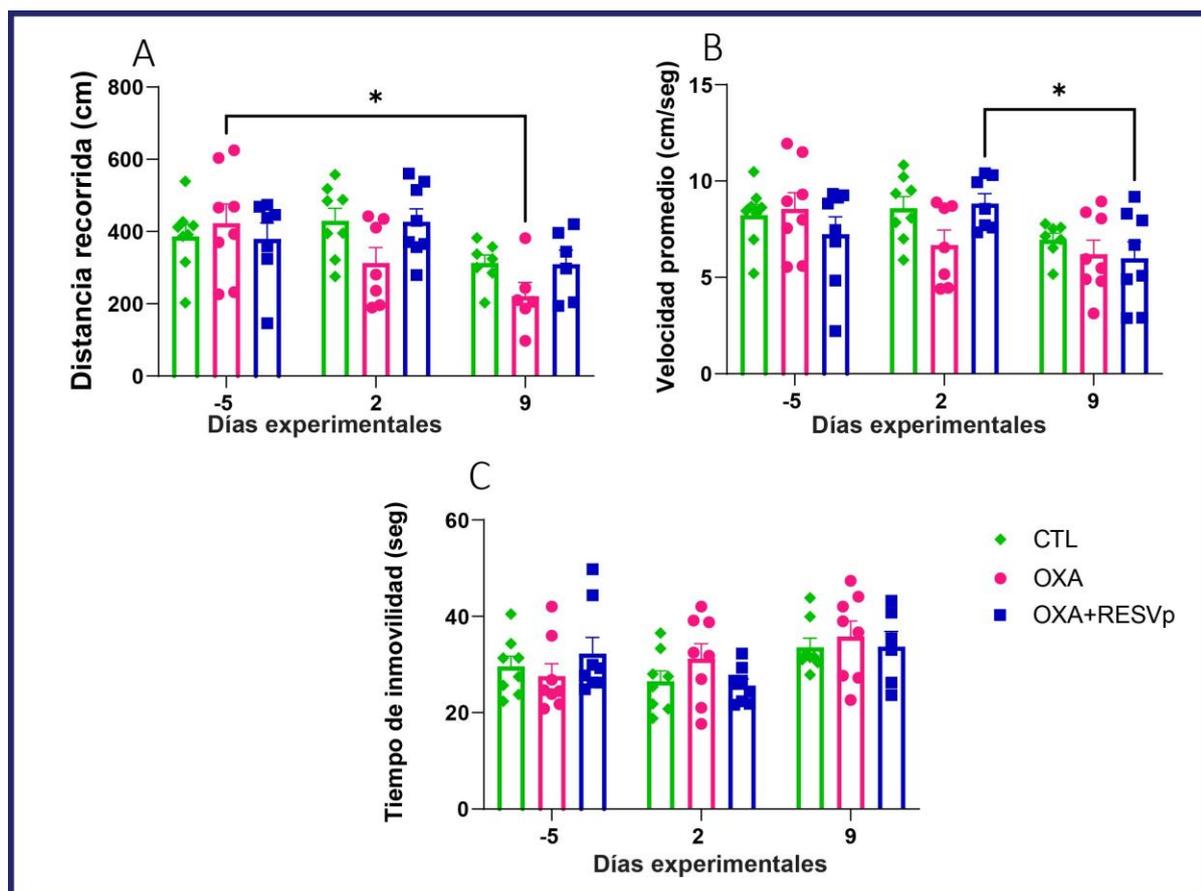


Figura 50. Parámetros asociados a locomoción: distancia recorrida (A), velocidad promedio (B) y tiempo de inmovilidad (C) evaluados mediante la prueba de campo abierto y analizados con el software Image J. Se incluyeron 12 animales por grupo experimental. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test ANOVA de 2 vías de medidas repetitivas seguido por el test de Tukey para comparar entre tratamientos y el test de Bonferroni para comparar dentro de cada tratamiento a lo largo del tiempo. Sólo se muestran en el gráfico las diferencias estadísticamente significativas, utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.7 Efectos de la administración preventiva de resveratrol sobre los procesos de daño inducidos por oxaliplatino

Tras comprobar que la administración temprana y sostenida de resveratrol fue efectiva en prevenir el desarrollo de alodinia mecánica y térmica fría, se optó por mantener este esquema para analizar los efectos del polifenol sobre diferentes parámetros asociados al daño inducido por el antineoplásico. Estos estudios se realizaron en tejidos disecados 10 días después de haber iniciado la administración del quimioterápico, según se indica en la Fig. 10A de la sección Materiales y Métodos.

4.7.1 Disminución de marcadores de estrés y daño oxidativo

Como se mencionó previamente en la sección Resultados del Proyecto I, la administración de oxaliplatino indujo un aumento en los marcadores de estrés y daño oxidativo tanto en el nervio ciático como en los ganglios raquídeos. En este nuevo estudio, al incluir animales que también recibieron resveratrol de manera temprana y sostenida, observamos cambios significativos en comparación con el grupo OXA (Fig. 51A). En particular, en los nervios de los animales del grupo OXA+RESVp, las concentraciones de glutatión total fueron significativamente mayores que en los grupos CTL y OXA (Fig. 51A). Además, el resveratrol logró restaurar la relación GSH/GSSG, que se encontraba marcadamente disminuida en los animales que recibieron oxaliplatino (Fig. 51B).

Al analizar los niveles de peroxidación lipídica mediante la medición de TBARS, se encontró que los animales tratados con resveratrol presentaron niveles significativamente menores que los detectados en los animales OXA, siendo estos valores comparables a los observados en el grupo CTL, tanto en el nervio ciático (Fig. 51C) como en los ganglios raquídeos (Fig. 51D).

En conjunto, estos resultados destacan los importantes efectos antioxidantes del resveratrol en este modelo experimental, sugiriendo su potencial como estrategia neuroprotectora frente al daño inducido por oxaliplatino.

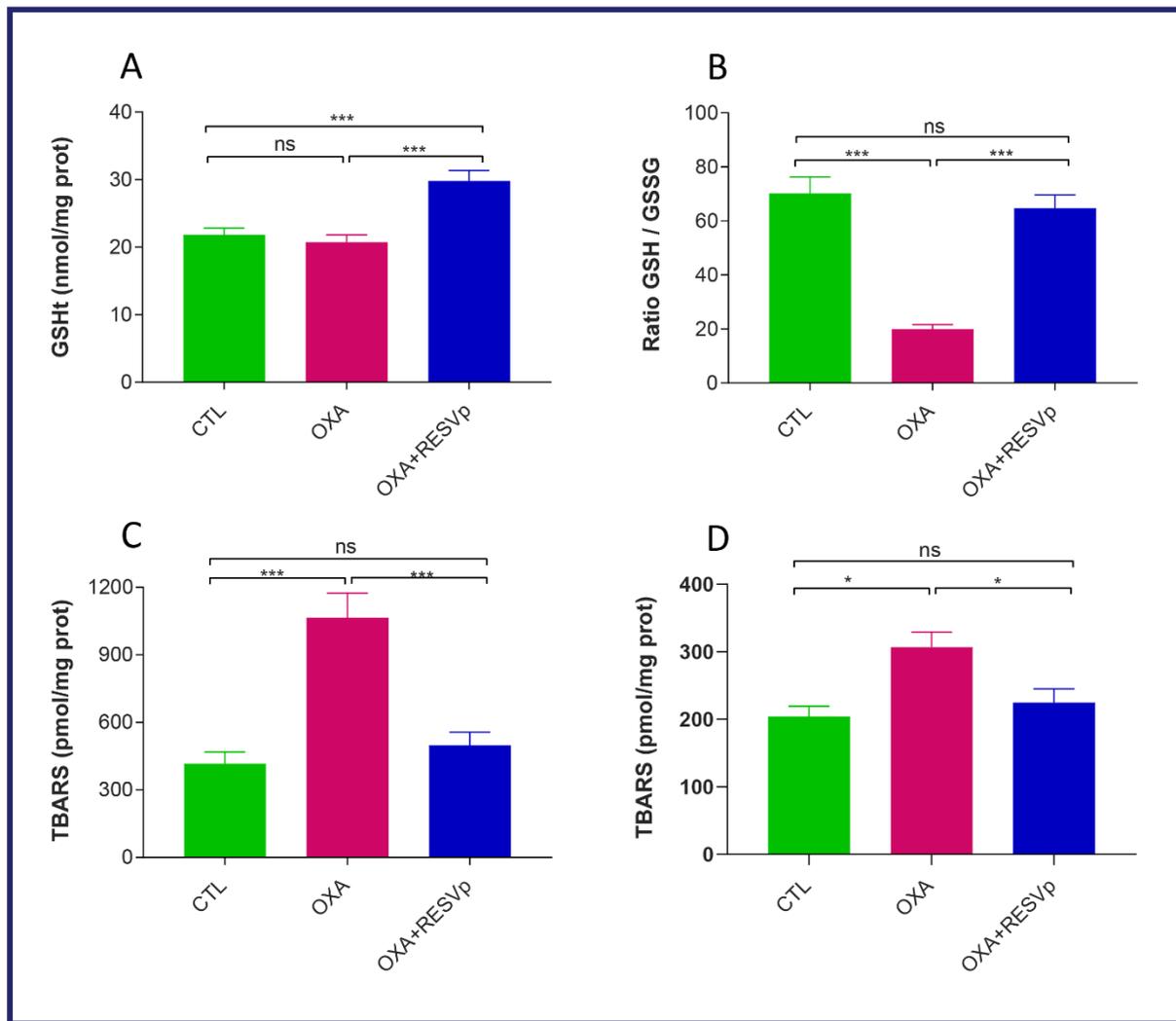


Figura 51. Niveles de GSht (A), relación GSH/GSSG (B) y niveles de TBARS (C) detectados en el nervio ciático de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. En (D) se muestran los niveles de TBARS en ganglios raquídeos. Se incluyeron 6 muestras por grupo experimental. Los datos presentados corresponden a la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4.7.2 Activación del sistema de defensa antioxidante

Dado que observamos que el resveratrol modulaba marcadores de estrés y daño oxidativo, decidimos investigar sus efectos sobre ciertos mediadores del sistema de defensa antioxidante. En particular, estudiamos los niveles de expresión de SIRT1 y Nrf2, sensores del equilibrio oxidativo celular y mediadores del proceso de biogénesis mitocondrial, y de las enzimas antioxidantes y detoxificantes NQO-1 y HO-1. Estos estudios fueron llevados a cabo mediante RT-PCR en tiempo real, en los ganglios y la médula espinal lumbar de animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales.

En los ganglios de los animales del grupo OXA detectamos niveles basales de expresión de SIRT1 y Nrf2 (Fig. 52 A y B), mientras que los niveles de ARNm correspondientes a NQO-1 y HO-1 se encontraron sobre-expresados en relación a animales control (Fig. 52 C y D).

Por su parte, la administración preventiva de resveratrol indujo un aumento significativo en la expresión de SIRT1 (Fig. 52A) y Nrf2 (Fig. 52B), tanto en relación a controles como a animales del grupo OXA. Además, el polifenol fue capaz de inducir una regulación positiva del mensajero de NQO-1, aún más marcada que la desencadenada por la exposición a oxaliplatino (Fig. 52C). Finalmente, en el caso de la enzima HO-1, en el grupo OXA+RESVp los niveles de expresión fueron similares a los del grupo OXA, aunque superiores a los del grupo CTL (Fig. 52D).

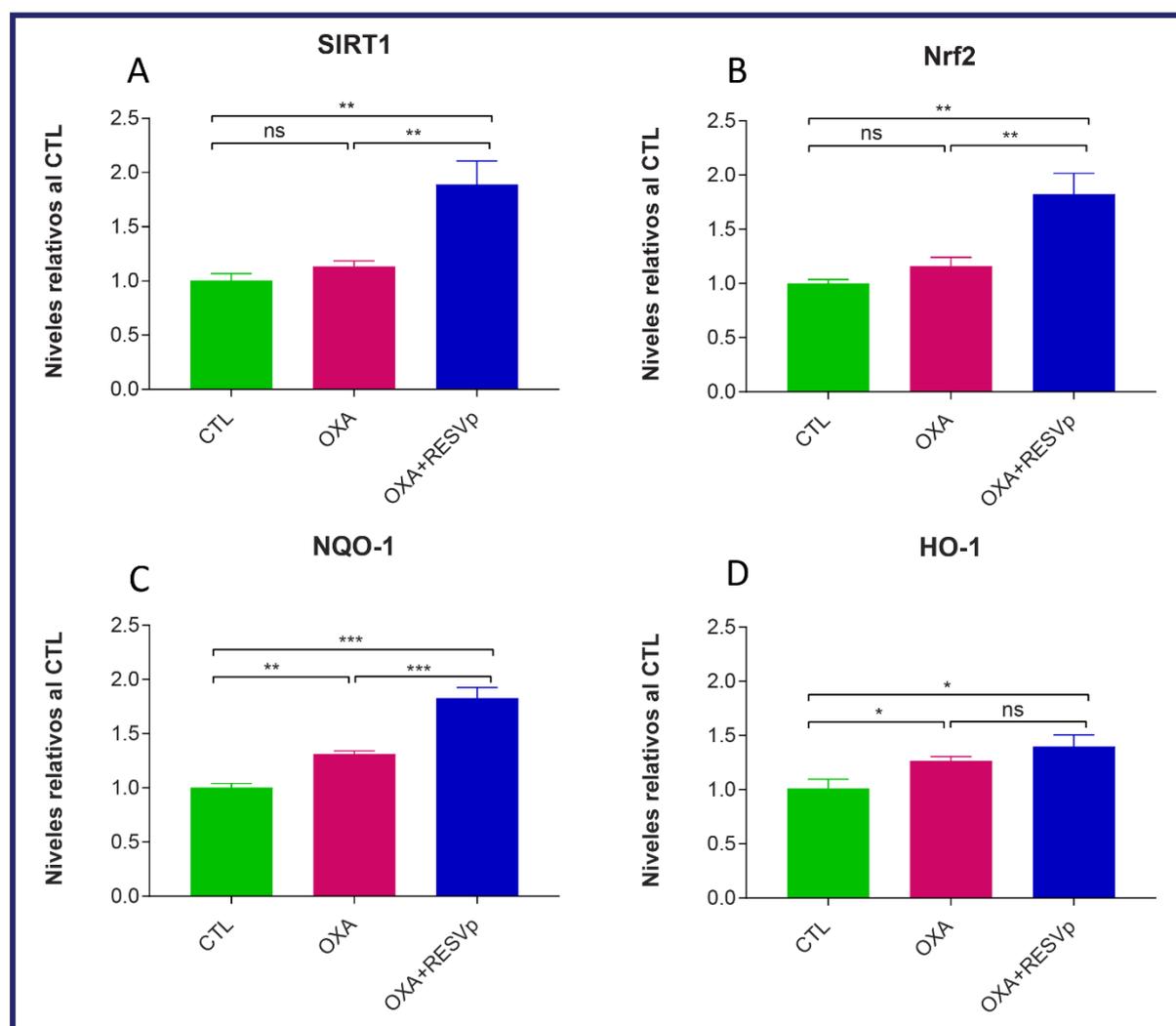


Figura 52. Niveles relativos de ARNm correspondientes a SIRT1 (A), Nrf2 (B), NQO-1 (C) y HO-1 (D) en los ganglios anexos a la raíz dorsal. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. Los datos presentados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Newman-Keuls. Se utilizaron los siguientes símbolos para representar la significancia estadística: ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En la médula espinal de los animales expuestos a oxaliplatino, no se observaron cambios en los niveles de los ARNm correspondientes a SIRT1 (Fig. 53A), NQO-1 (Fig. 53C) y HO-1 (Fig. 53D). Sin embargo, se detectó un aumento en la expresión del factor de transcripción Nrf2 (Fig. 53B). Por otro lado, la administración preventiva de resveratrol indujo un incremento en la expresión de SIRT1 (Fig. 53A), NQO-1 (Fig. 53C) y HO-1 (Fig. 53D), sin modificar los niveles de Nrf2, que permanecieron elevados (Fig. 53B).

En conjunto, estos hallazgos indican que el resveratrol modula positivamente la expresión de diversos mediadores del sistema de defensa antioxidante en los ganglios raquídeos e incluso a nivel de la médula espinal. Estas acciones podrían explicar la capacidad del polifenol para reducir los marcadores de estrés y daño oxidativo en estos tejidos.

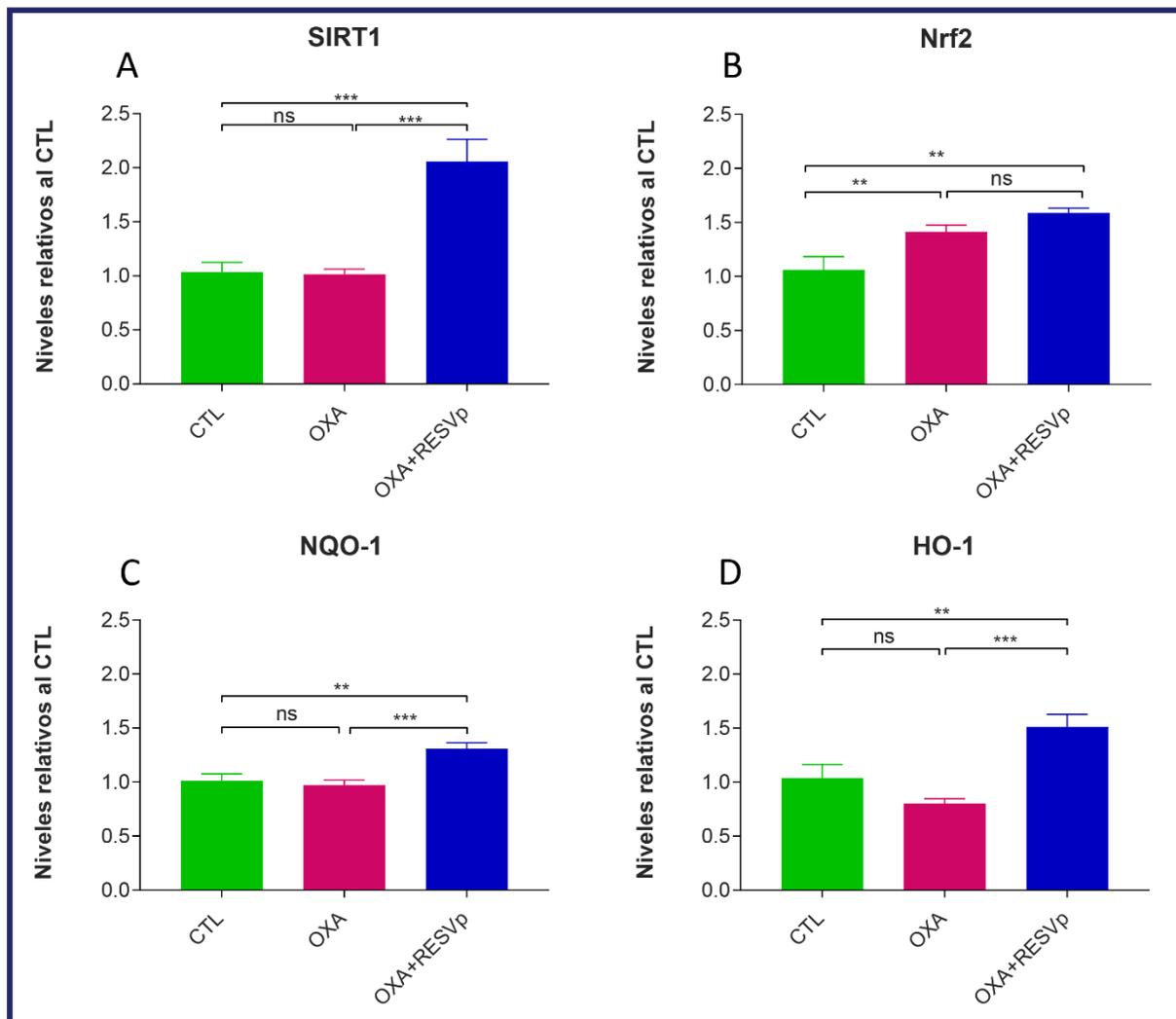


Figura 53. Niveles relativos de ARNm correspondientes a SIRT1 (A), Nrf2 (B), NQO-1 (C) y HO-1 (D) en la médula espinal de los diferentes grupos experimentales, a 10 días de iniciado el tratamiento con oxaliplatino. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. En todos los casos, los datos presentados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Newman-Keuls (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.7.3 Disminución de marcadores de neuroinflamación y daño neuronal

Considerando la potente respuesta antioxidante inducida por el resveratrol en los animales expuestos a oxaliplatino, decidimos evaluar los efectos del polifenol sobre diferentes marcadores relacionados con neuroinflamación y daño y activación neuronal.

Como se mencionó previamente en la sección Resultados del Proyecto I, la administración de oxaliplatino generó un aumento de los mediadores pro-inflamatorios y de los marcadores de daño y activación neuronal, tanto a nivel de los ganglios como de la médula espinal.

Al analizar la inmunoreactividad para GFAP en ganglios raquídeos observamos que en los animales que recibieron la administración preventiva de resveratrol la señal inmunoreactiva fue significativamente menor a la detectada en animales del grupo OXA y similar a la detectada en animales del grupo CTL, como se observa en la figura 54.

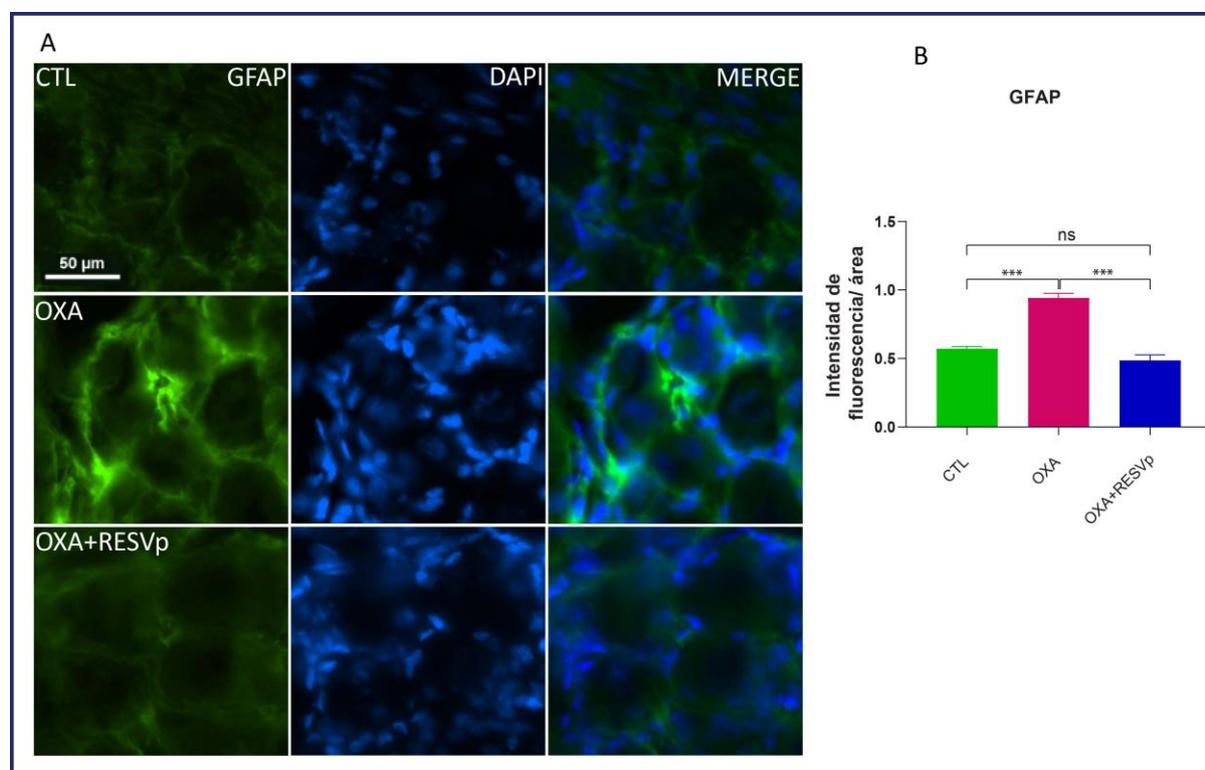


Figura 54. Microfotografías ilustrativas de la inmunoreactividad para GFAP en los ganglios anexos a la raíz dorsal L4-6 (A). En el panel superior se muestran fotografías de ganglios controles, en el panel medio las correspondientes a ganglios de animales expuestos a oxaliplatino, y en el panel inferior fotografías de ganglios de animales que recibieron oxaliplatino y resveratrol. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcador con el colorante DAPI (fluorescencia azul). Intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales (B). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando ANOVA de 1 vía (***) $p < 0.001$).

En las secciones de médula espinal, la inmunoreactividad para GFAP se encontró notablemente reducida en los animales tratados con resveratrol, en comparación con el grupo que recibió oxaliplatino (Fig. 55). Además, la señal observada en este grupo fue comparable a la del grupo control, lo que sugiere que el tratamiento con resveratrol podría atenuar la activación astrocitaria inducida por el oxaliplatino.

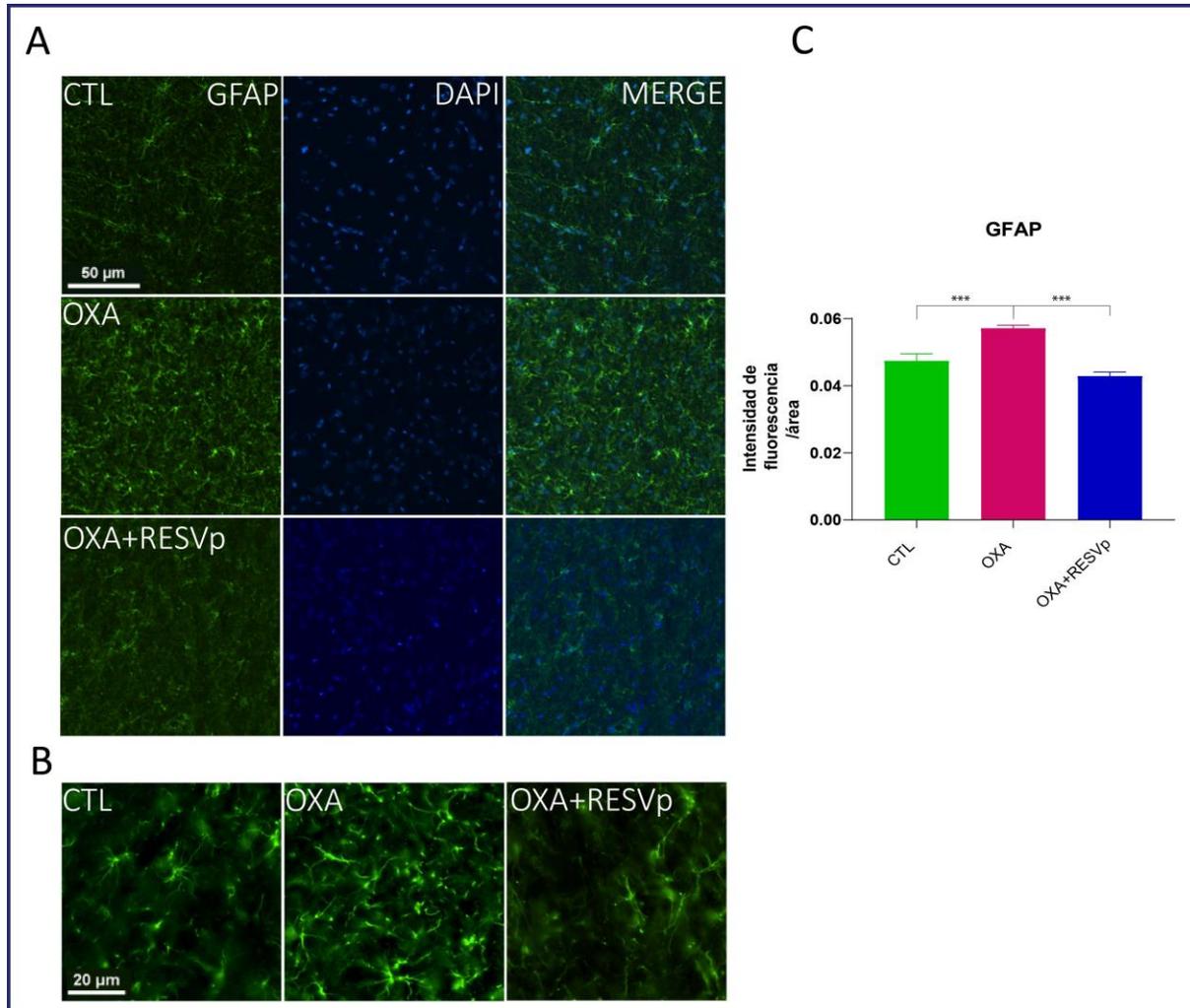


Figura 55. Microfotografías ilustrativas de la inmunoreactividad para GFAP (A) en la médula espinal lumbar. En el panel superior se muestran fotografías de médulas controles, en el panel medio las correspondientes a médulas de animales expuestos a oxaliplatino, y en el panel inferior fotografías de médulas de animales que recibieron oxaliplatino y resveratrol. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcador con el colorante DAPI (fluorescencia azul). En (B) se muestra una imagen a mayor aumento que permite apreciar la morfología de las células marcadas, y en (C) se grafica la intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales (B). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados el test ANOVA de 1 vía (***) $p < 0.001$.

Por su parte, al analizar la inmunoreactividad para IBA-1 en secciones de la médula espinal lumbar observamos que en los animales que recibieron resveratrol la señal inmunoreactiva fue significativamente menor a la detectada en animales del grupo OXA y similar a la detectada en animales del grupo CTL (Fig. 56).

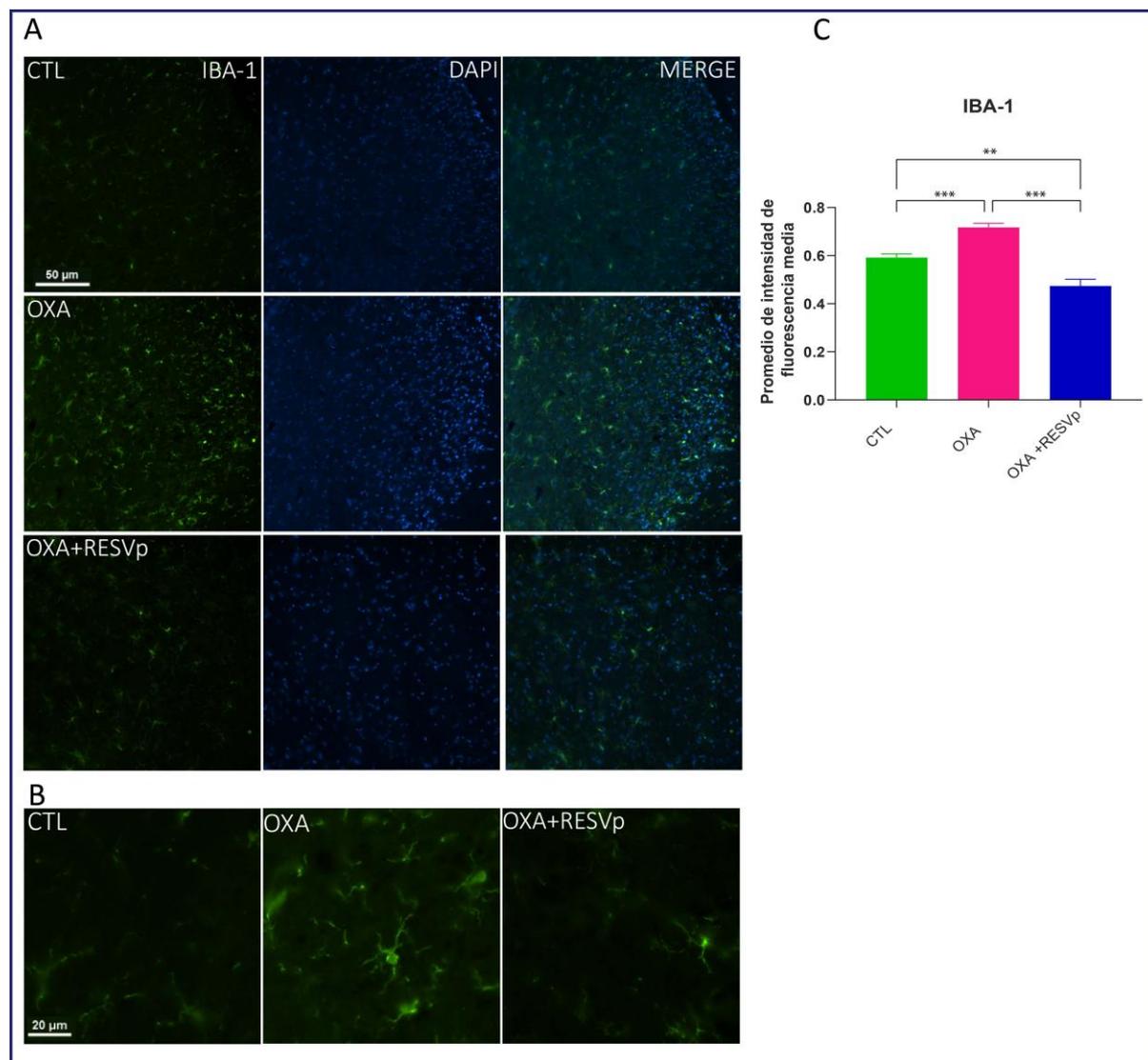


Figura 56. Microfotografías ilustrativas de la inmunoreactividad para IBA-1 (A) en la médula espinal lumbar. En el panel superior se muestran fotografías de médulas controles, en el panel medio las correspondientes a médulas de animales expuestos a oxaliplatino, y en el panel inferior fotografías de médulas de animales que recibieron oxaliplatino y resveratrol. En las imágenes pueden identificarse también los núcleos celulares marcador con el colorante DAPI (fluorescencia azul). En (B) se muestra una imagen a mayor aumento que permite apreciar la morfología de las células marcadas, y en (C) se grafica la intensidad de fluorescencia de GFAP por unidad de área en ganglios de animales pertenecientes a ambos grupos experimentales (B). Se incluyeron 5 animales por grupo experimental. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados el test ANOVA de 1 vía (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

La administración del polifenol resultó además en niveles basales de expresión de NFκB (Fig. 57A), TNFα (Fig. 57B) y ATF3 (Fig. 57C) en los ganglios raquídeos. De hecho, estos tres marcadores se mantuvieron en niveles significativamente menores a los detectados en animales expuestos a oxaliplatino y fueron comparables a los del grupo control. Cabe destacar que no detectamos cambios en la expresión de c-fos en los ganglios de animales de los grupos OXA u OXA+RESVp (Fig. 57D).

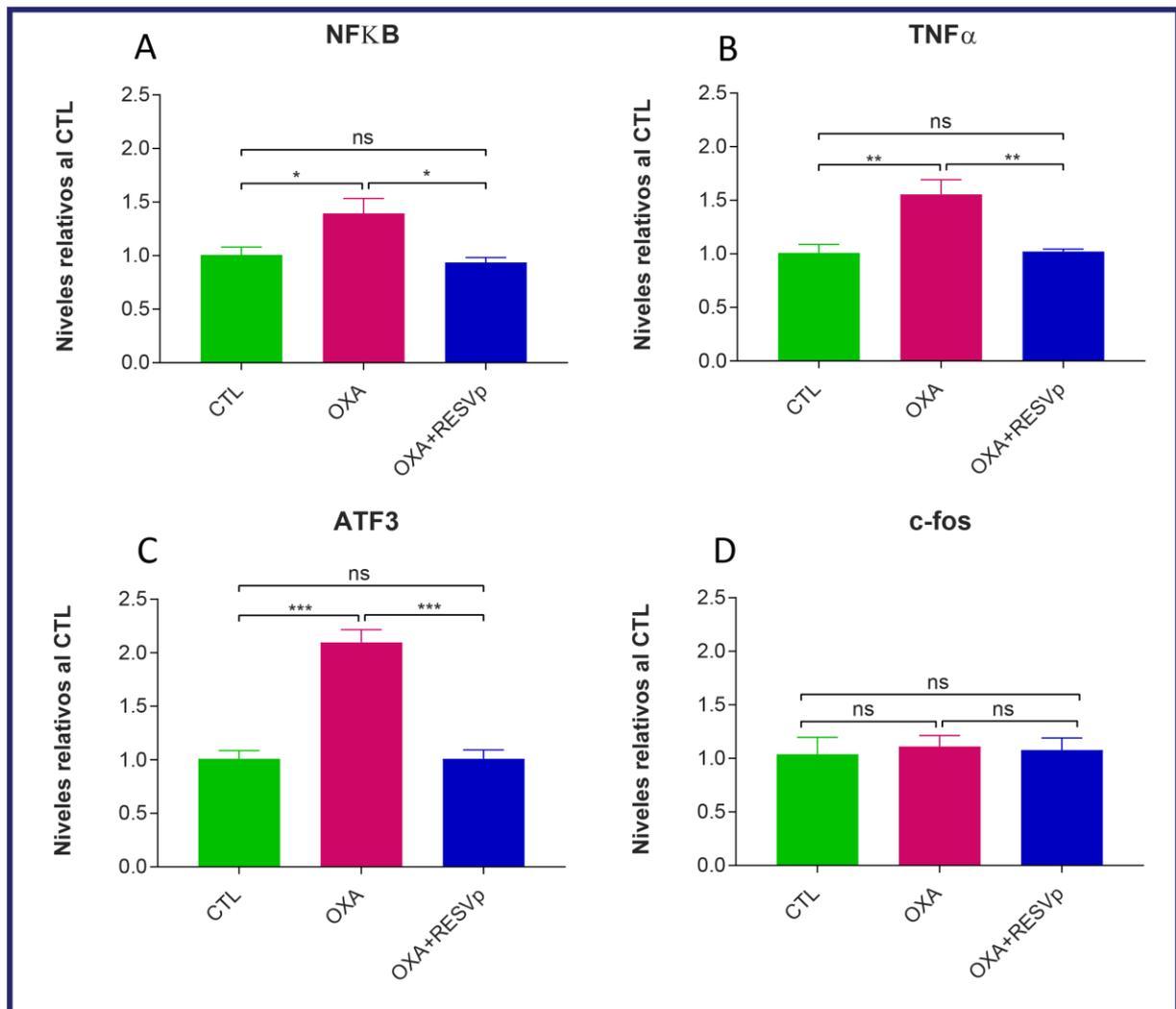


Figura 57. Niveles relativos de ARNm correspondientes a NFκB (A), TNFα (B), ATF3 (C), c-fos (D) en los ganglios anexos a la raíz dorsal de los diferentes grupos experimentales, 10 días después de iniciado el ciclo de oxaliplatino. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. En todos los casos, los datos presentados corresponden a la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Newman-Keuls (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

En la médula espinal, la administración oral de resveratrol resultó en niveles basales de expresión de NFκB (Fig. 58A), TNFα (Fig. 58B) y c-fos (Fig. 58D). En todos los casos los niveles de los mensajeros fueron significativamente menores a los detectados en animales del grupo OXA. El análisis del marcador de daño neuronal ATF-3 no mostró diferencias en ninguno de los grupos evaluados (Fig. 58C).

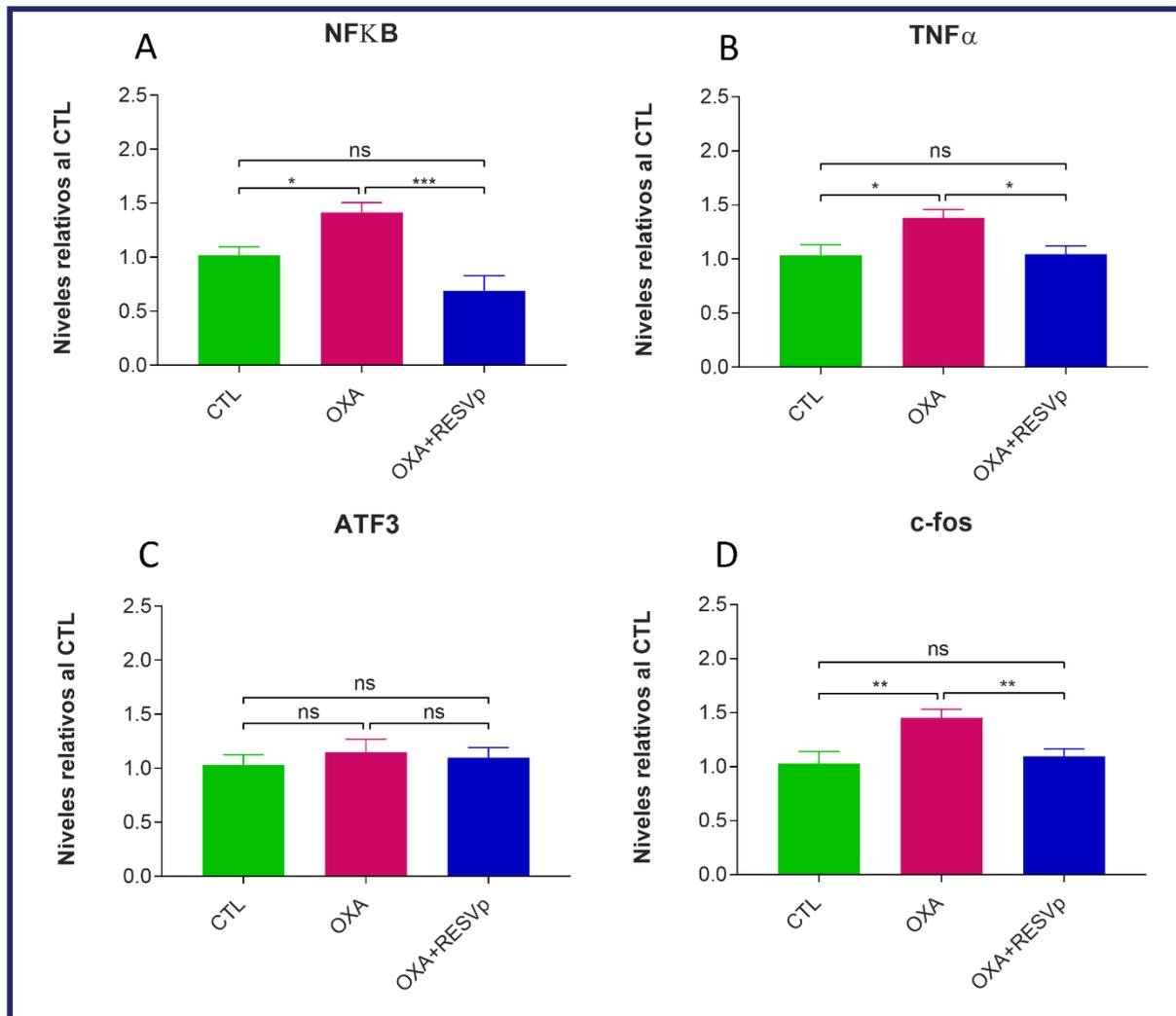


Figura 58. Niveles relativos de ARNm correspondientes a NFκB (A), TNFα (B), ATF3 (C), c-fos (D) en la médula espinal dorsal de los diferentes grupos experimentales, a 10 días de iniciado el tratamiento con oxaliplatino o la solución salina. Se incluyeron 8 muestras por grupo experimental. En todos los casos, los datos presentados corresponden a la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Newman-Keuls (ns p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

En resumen, la administración temprana y sostenida de resveratrol logró mitigar los procesos neuroinflamatorios y ejercer acciones neuroprotectoras reduciendo el daño y la activación neuronal en estructuras clave de la neurotransmisión nociceptiva, en este modelo de NPIQ.

4.8 Impacto del resveratrol sobre la eficacia antitumoral del oxaliplatino

Con el objeto de determinar si la administración de resveratrol interfería con los efectos antitumorales del oxaliplatino, evaluamos a lo largo del tiempo el volumen de tumores inducidos mediante la inoculación de células CT26, siguiendo el protocolo experimental detallado en la figura 11 de Materiales y Métodos. En los animales que recibieron únicamente el inóculo celular, se observó un crecimiento progresivo del tumor, cuyo volumen alcanzó un valor promedio de 1826 mm³ al final del experimento (día 10, Fig. 59).

En el grupo de animales tratados con oxaliplatino tras la inoculación de células, el crecimiento tumoral fue significativamente menor, con un volumen promedio de 752 mm³ al finalizar el experimento (Fig. 59).

Por último, en los animales que recibieron el inóculo celular, oxaliplatino y resveratrol, la evolución del volumen tumoral fue similar a la observada en el grupo tratado únicamente con oxaliplatino, alcanzando un valor promedio de 294 mm³ al término del período experimental (Fig. 59). Estos resultados sugieren que la administración temprana y sostenida de resveratrol no interfiere con las acciones antitumorales del oxaliplatino.

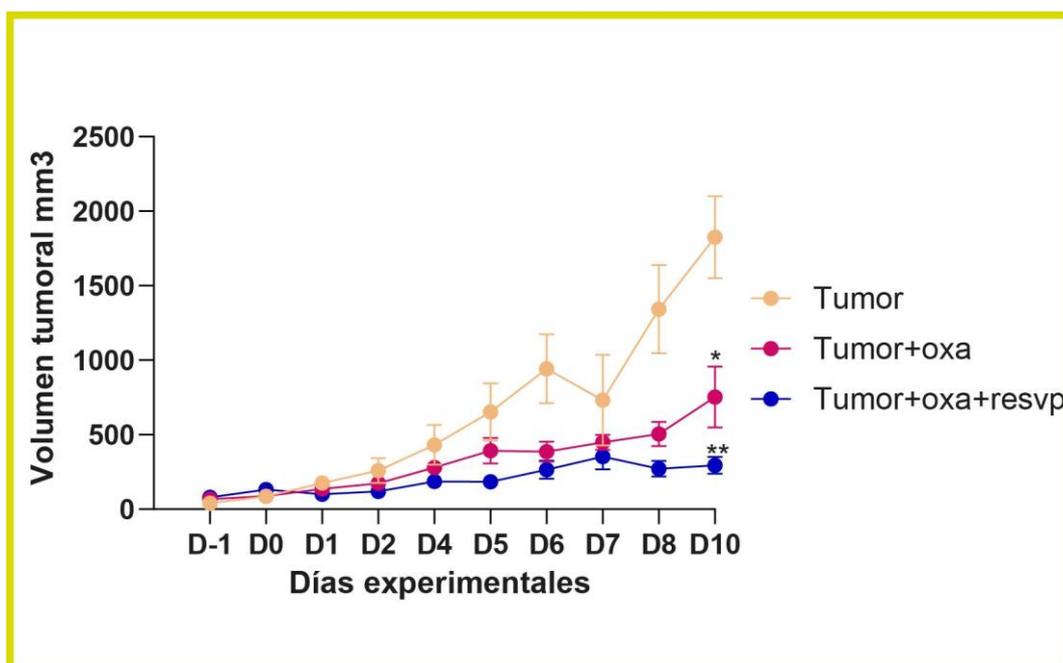


Figura 59. Crecimiento tumoral en ratones bajo diferentes condiciones de tratamiento. Se muestra la evolución del volumen tumoral (mm³) a lo largo de los días experimentales en tres grupos: control (Tumor), tratamiento con oxaliplatino (Tumor + OXA) y tratamiento combinado con oxaliplatino y resveratrol (Tumor + OXA + RESVp). Los días de administración del quimioterápico se representan con las flechas verticales, y el período de administración de resveratrol se representa con la barra gris. Se incluyeron al menos 6 animales por grupo experimental. Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetitivas, seguido por el test de Tukey. Se utilizaron los siguientes símbolos para representar las diferencias estadísticamente significativas identificadas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs tumor en ambos casos.

Proyecto IV

Dado que en el modelo preclínico observamos marcadas diferencias asociadas al sexo, tanto a nivel comportamental como mecanístico, decidimos analizar si los pacientes que recibían oxaliplatino también mostraban diferencias asociadas al sexo en la prevalencia, presentación y severidad del cuadro clínico. Para ello, se llevó a cabo un estudio observacional en el que se evaluó la prevalencia de síntomas compatibles con neuropatía, la presentación clínica, y la asociación con diferentes variables demográficas, antropométricas, asociadas al tumor o asociadas al tratamiento.

4.9 Estudio observacional en pacientes oncológicos tratados con oxaliplatino

4.9.1 Características demográficas y clínicas de la cohorte en estudio

La población en estudio consistió en 56 pacientes con carcinoma colorrectal que recibieron tratamiento con oxaliplatino en el Hospital Universitario Austral, hospital de referencia de la Provincia de Buenos Aires. Esta cohorte incluyó 30 hombres (54%) y 26 mujeres (46%), con edades comprendidas entre 25 y 84 años al momento del diagnóstico (Tabla 5). El 52% de los pacientes presentaba sobrepeso al momento del diagnóstico oncológico (Tabla 5).

Todos los pacientes (n=56, 100%) recibieron oxaliplatino, la mayoría (n=53, 94%) para el tratamiento de estadios avanzados (III, IV) del tumor (Tabla 5). Mientras que el 46% de los pacientes fue tratado en adyuvancia, el 54% recibió oxaliplatino como tratamiento de primera línea. Los regímenes utilizados incluyeron FOLFOX en el 45% de los pacientes y XELOX en el 55% de los casos (Tabla 5). La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio (n=36, 64%) recibió dosis acumuladas de oxaliplatino superiores a 520 mg/m² (Tabla 5).

Variable	Todos los pacientes	Pacientes con NPIQ	Pacientes sin NPIQ
n	56 (100)	41 (73)	15 (27)
Sexo			
Masculino	30 (54)	18 (44)	12 (80)
Femenino	26 (46)	23 (56)	3 (20)
Edad			
25-34	2 (4)	1 (2)	1 (7)
35-44	8 (14)	5 (12)	3 (20)
45-54	13 (23)	11 (27)	2 (13)
55-64	15 (27)	12 (29)	3 (20)
65-74	14 (25)	11 (27)	3 (20)
75-84	4 (7)	1 (2)	3 (20)
Sobrepeso			
Sí	29 (52)	20 (48)	9 (60)
No	27 (48)	21 (52)	6 (40)
Estadio tumoral			
I	1 (2)	1 (2)	0 (0)
II	2 (4)	2 (5)	0 (0)
III	24 (42)	18 (44)	6 (40)
IV	29 (52)	20 (49)	9 (60)
Esquema quimioterápico			
FOLFOX	25 (45)	18 (44)	7 (47)
XELOX	31 (55)	23 (56)	8 (53)
Dosis Acumulada (mg/m²)			
Hasta 520	20 (36)	12 (29)	8 (53)
521-1040	31 (55)	25 (61)	6 (40)
>1040	5 (9)	4 (10)	1 (7)

Tabla 5. Variables demográficas, individuales, asociadas al tumor y al esquema quimioterápico utilizado en la población en estudio, diferenciando los pacientes que desarrollaron neuropatía periférica inducida por quimioterapia y aquellos que no. Los datos se encuentran expresados como n (%).

4.9.2 Prevalencia de neuropatía inducida por oxaliplatino

En la cohorte en estudio, 41 pacientes desarrollaron síntomas compatibles con neuropatía, reflejando una prevalencia general del 73% (Tabla 5, Fig. 60). La mayoría de los pacientes (n=21, 51%) desarrolló síntomas sólo durante el tratamiento, mientras que el 19% (n=8) expresó síntomas únicamente postratamiento, y el 29% (n=12) los manifestó tanto durante como después del tratamiento con oxaliplatino.



Figura 60. Prevalencia de síntomas compatibles con neuropatía inducida por quimioterapia en la cohorte estudiada.

4.9.3 Asociación entre el desarrollo de neuropatía y variables demográficas, clínicas y asociadas al tratamiento

Se evaluó a continuación la asociación entre el desarrollo de NPIQ y diferentes variables demográficas, antropométricas, asociadas al tumor o relacionadas al tratamiento.

De los 41 pacientes que desarrollaron neurotoxicidad periférica, la mayoría (n=23, 56%) fueron mujeres (Tabla 5). La prevalencia de NPIQ en las mujeres fue del 88% (n=23/26), mientras que la prevalencia en los hombres fue del 60% (n=18/30) (Tabla 5, Fig. 61). Estos datos revelan una asociación significativa entre el sexo femenino y el desarrollo de síntomas compatibles con NPIQ (p=0.01, OR=5.11, IC 95%= 1.35-19.38).

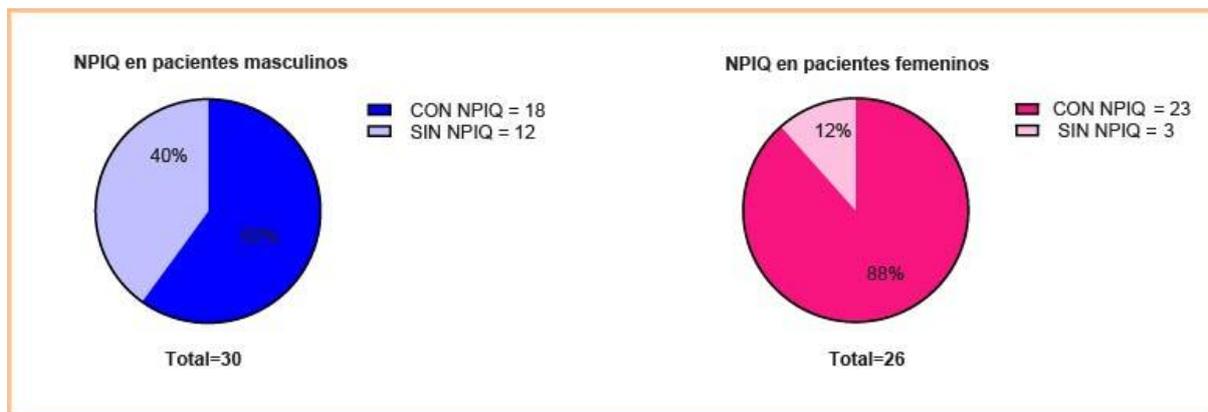


Figura 61. Prevalencia de síntomas compatibles con neuropatía inducida por quimioterapia en hombres y en mujeres.

En relación a la edad, el 83% de los pacientes con NPIQ tenía entre 45 y 74 años al momento del diagnóstico (Tabla 5). La distribución de edad de los pacientes que no desarrollaron neurotoxicidad fue más heterogénea (Tabla 5). Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la edad y el desarrollo de NPIQ (p>0.05). Asimismo, tampoco se detectó una asociación significativa entre NPIQ y otras variables como el sobrepeso, el estadio tumoral o el esquema quimioterápico utilizado (Tabla 5, p>0.05 en todos los casos).

La mayoría de los pacientes que desarrollaron neurotoxicidad (n=29, 71%) recibieron dosis acumuladas superiores a 520 mg/m², mientras que la mayoría de los pacientes que no manifestaron síntomas (n=8, 53%) recibieron dosis acumuladas inferiores a dicho valor, habitualmente utilizado como límite entre dosis bajas y dosis altas. No obstante, no se detectó asociación entre el desarrollo del cuadro clínico y el rango de dosis (p>0.05).

De este modo, sólo se identificó asociación entre el sexo femenino y el desarrollo de NPIQ, sin identificarse asociación con ninguna otra variable en estudio.

4.9.4 Diferencias asociadas al sexo en la cohorte completa

Dada la mayor prevalencia de NPIO en el grupo de pacientes mujeres, se decidió analizar la existencia de diferencias asociadas al sexo en las variables demográficas, antropométricas, asociadas al tumor o relacionadas al tratamiento. En la cohorte en estudio, no se observaron diferencias entre hombres y mujeres en relación con la edad al momento del diagnóstico del tumor (Tabla 6, $p>0.05$).

Variable	Todos los pacientes	Hombres	Mujeres
n	56 (100)	30 (54)	26 (46)
Edad			
25-34	2 (4)	1 (3)	1 (4)
35-44	8 (14)	4 (13)	4 (15)
45-54	13 (23)	6 (20)	7 (27)
55-64	15 (27)	8 (27)	7 (27)
65-74	14 (25)	7 (23)	7 (27)
75-84	4 (7)	4 (13)	0 (0)
Sobrepeso			
Sí	29 (52)	20 (67)	9 (35)
No	27 (48)	10 (33)	17 (65)
Estadio tumoral			
I	1 (2)	0 (0)	1 (4)
II	2 (4)	2 (7)	0 (0)
III	24 (43)	11 (37)	13 (50)
IV	29 (52)	17 (57)	12 (46)
Esquema quimioterápico			
FOLFOX	25 (45)	17 (57)	8 (31)
XELOX	31 (55)	13 (43)	18 (69)

Tabla 6. Variables demográficas, asociadas al tumor y al esquema quimioterápico utilizado en la población en estudio, diferenciando hombres y mujeres. Los datos se encuentran expresados como n (%).

Al evaluar la asociación entre sexo y sobrepeso se encontró que el 67% de los hombres (20/30) y el 35% de las mujeres (9/26) presentaban sobrepeso (Tabla 6), identificándose una asociación significativa entre el sexo masculino y la presencia de sobrepeso ($p=0.0167$, $OR=0.26$, $IC\ 95\%= 0.09-0.78$). En efecto, el IMC de los hombres resultó significativamente mayor al de las mujeres (Fig. 62, $p=0.0335$).

Como puede observarse en la Tabla 6, tanto hombres como mujeres recibieron oxaliplatino generalmente para el tratamiento de estadios avanzados del tumor, sin evidenciarse asociación alguna entre sexo y estadio tumoral ($p>0.05$).

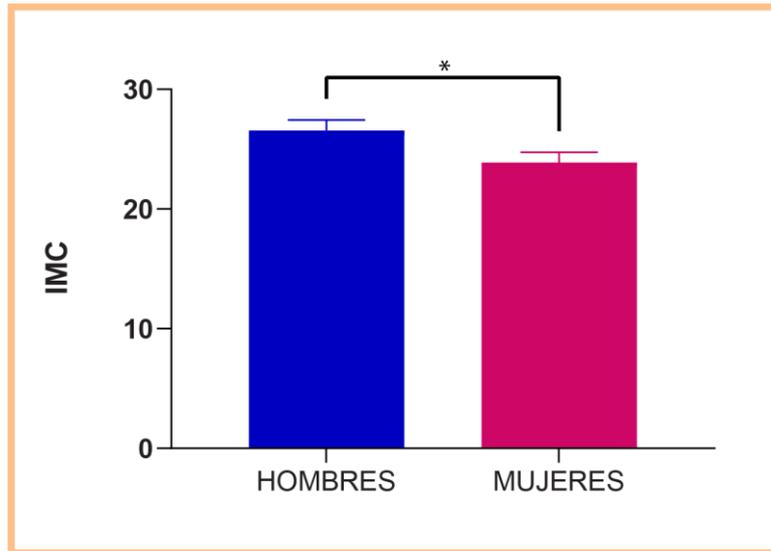


Figura 62. Índice de masa corporal (IMC) de hombres y mujeres de la cohorte completa. Los datos corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test de Student (* $p < 0.05$).

Finalmente, al analizar la relación entre el sexo y el esquema quimioterápico, se observó una marcada tendencia a que las mujeres fueran tratadas preferentemente con XELOX ($p=0.0519$). En este sentido, el 57% de los hombres ($n=17$) recibió FOLFOX, mientras que el 69% de las mujeres ($n=18$) recibió XELOX (Tabla 6). De este modo, el 68% de los pacientes que recibió folfox fueron hombres mientras que el 58% de los pacientes que recibió xelox fueron mujeres (Fig. 63).

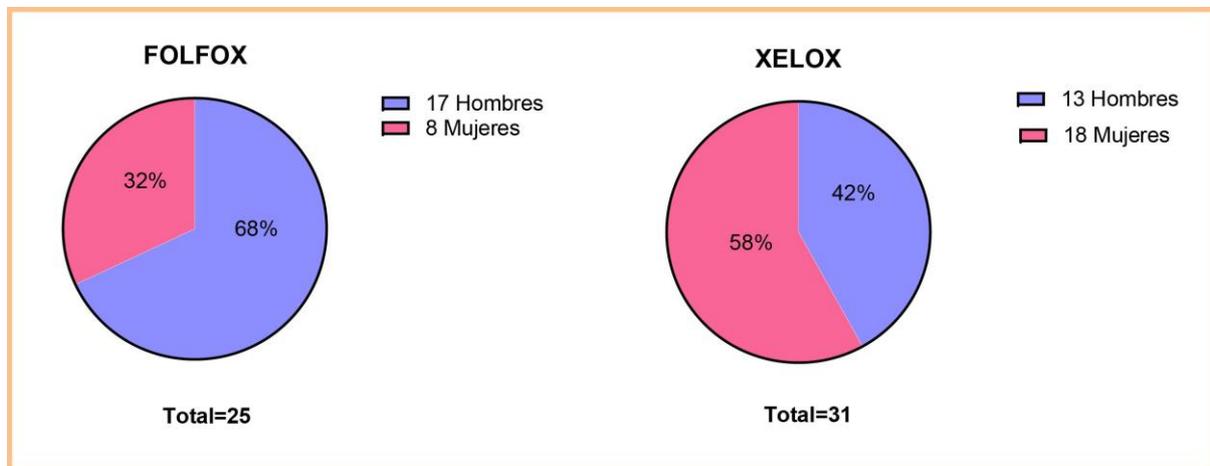


Figura 63. Porcentaje de pacientes tratados con los regímenes quimioterápicos XELOX y FOLFOX según el sexo.

En conclusión, en la cohorte completa sólo resultaron estadísticamente significativas las diferencias asociadas al sexo en la prevalencia de sobrepeso, siendo esta significativamente mayor en hombres.

4.9.5 Diferencias asociadas al sexo en el subgrupo de pacientes que desarrolló neurotoxicidad.

En el subgrupo de pacientes que desarrolló neurotoxicidad periférica, el 82% de las pacientes mujeres y el 82% de los pacientes hombres se encontraban en el rango de edad de 45 a 74 años (Tabla 7). El IMC de los hombres resultó ser significativamente mayor ($p=0.0404$), identificándose nuevamente una asociación entre el sexo masculino y la presencia de sobrepeso ($p=0.0427$, $OR=3.75$, $IC\ 95\%= 1.06-13.28$). Además, la mayoría de los hombres con NPIQ recibió FOLFOX ($n=11$, 61%), mientras que la mayoría de las mujeres recibió XELOX ($n=15$, 65%) (Tabla 7), detectándose una asociación entre el sexo femenino y la utilización del esquema XELOX ($p=0.0495$, $OR=3.59$, $IC\ 95\%= 1.02 - 12.68$).

Variable	Pacientes con NPIQ		
	Total	Hombres	Mujeres
n	41 (100)	18 (44)	23 (56)
Edad			
25-34	1 (2)	0 (0)	1 (4)
35-44	5 (12)	2 (11)	3 (13)
45-54	11 (27)	4 (22)	7 (30)
55-64	12 (29)	6 (33)	6 (26)
65-74	11 (27)	5 (28)	6 (26)
75-84	1 (2)	1 (6)	0 (0)
Sobrepeso			
Sí	20 (49)	12 (67)	8 (35)
No	21 (51)	6 (33)	15 (65)
Esquema quimioterápico			
FOLFOX	25 (45)	11 (61)	7 (30)
XELOX	31 (55)	7 (39)	15 (65)
Periodo de manifestación			
Durante QT	21 (51)	6 (33)	15 (65)
Después QT	8 (20)	2 (11)	6 (26)
Durante y después QT	12 (29)	10 (56)	2 (9)
Reducción de dosis o suspensión del tratamiento	17 (41)	9 (50)	8 (35)

Tabla 7. Variables demográficas, asociadas al tumor y al esquema quimioterápico utilizado, así como características relacionadas al período de manifestación y severidad de los síntomas en los pacientes que desarrollaron neuropatía, diferenciando hombres y mujeres. Los datos se encuentran expresados como n (%).

La mayoría de las pacientes mujeres (65%) manifestaron síntomas sólo durante el período de administración de oxaliplatino, mientras que la mayoría de los pacientes hombres (55%) manifestaron síntomas tanto durante como después de la quimioterapia (Tabla 7). Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre el sexo y el período de

presentación clínica ($p>0.05$). Interesantemente, sí se identificó asociación entre el sexo masculino y la administración de dosis acumuladas superiores a 520 mg/m^2 ($p=0.0368$, $OR=4.58$ $IC\ 95\%= 1.12-18.76$).

Finalmente, mientras sólo 8 (35%) de las mujeres con NPIQ requirió reducir la dosis o interrumpir el tratamiento con oxaliplatino debido al desarrollo de síntomas severos de neurotoxicidad, el 50% ($n=9$) de los hombres debió hacerlo (Tabla 7). No obstante, la asociación entre sexo y modificación o interrupción del esquema terapéutico resultó ser no significativa.

De este modo, en el subgrupo de pacientes con neurotoxicidad periférica, se identificaron varias diferencias asociadas al sexo: los hombres presentaron una mayor prevalencia de sobrepeso y recibieron dosis acumuladas más altas, mientras que el esquema XELOX se utilizó con mayor frecuencia en mujeres. Además, se detectaron indicios de una mayor severidad del cuadro clínico en los hombres que manifestaron con mayor frecuencia la persistencia de síntomas después de finalizado el ciclo de quimioterapia o debieron reducir la dosis o interrumpir el fármaco.

4.9.6 Prevalencia de neuropatía inducida por oxaliplatino en el subgrupo de pacientes tratados con XELOX

Dada la mayor prevalencia de síntomas compatibles con neuropatía en mujeres y la observación de que, en el subgrupo de pacientes que desarrolló neurotoxicidad periférica, las mujeres fueron tratadas preferentemente XELOX, se decidió realizar un análisis específico en el grupo de pacientes que recibió XELOX ($n=31$). En este subgrupo, 7 de los 13 hombres y 15 de las 18 mujeres presentaron síntomas compatibles con NPIQ (Tabla 7), identificándose nuevamente una asociación significativa entre el sexo femenino y el desarrollo de neuropatía ($p=0.0278$, $OR=6.86$, $IC\ 95\%= 1.26-37.34$). Al analizar el grupo de pacientes tratados con FOLFOX, no se identificó asociación entre sexo y desarrollo de neurotoxicidad ($p>0.05$).

Finalmente, dado que en el subgrupo de pacientes que desarrolló neurotoxicidad periférica, las mujeres mostraron menor IMC ($p<0.040$), se decidió realizar este análisis también en el grupo de pacientes tratados XELOX ($n=31$). En esta población no se observó diferencia en el IMC de hombres y mujeres ($p=0.1425$), ni tampoco asociación entre sexo y sobrepeso ($p=0.2130$).

5. DISCUSIÓN

5.1 Consideraciones generales

En este trabajo de tesis doctoral se lograron abordar con éxito los objetivos inicialmente propuestos. Los resultados obtenidos han contribuido a comprender los **mecanismos celulares y moleculares** involucrados en la NPIO, así como a la caracterización de las conductas asociadas a dolor neuropático en un modelo experimental clínicamente relevante. Se identificaron al estrés oxidativo y a la activación glial en ganglios raquídeos y médula espinal como procesos centrales en la neurotoxicidad inducida por el fármaco y en la génesis del dolor.

Asimismo, se hallaron **diferencias significativas asociadas al sexo** en la manifestación de los síntomas, tanto a nivel preclínico como en pacientes, así como diferencias en la activación de células gliales y en la modulación de sistemas con un rol clave en la generación y modulación del dolor, como los canales TRP y el sistema endocannabinoide. En los pacientes, la prevalencia de neuropatía mostró asociación con el sexo, sin que se observara relación con otras variables demográficas, clínicas o vinculadas al tratamiento. Estos hallazgos reafirman la importancia de incorporar sistemáticamente la variable sexo en el diseño y análisis de estudios preclínicos y clínicos sobre NPIO.

Además, se comprobó que la administración de **resveratrol en esquema preventivo ejerce efectos neuroprotectores** relevantes, a través de la activación del sistema antioxidante endógeno, la atenuación del daño oxidativo y la modulación de procesos neuroinflamatorios, logrando prevenir las conductas indicativas de dolor sin comprometer la eficacia antitumoral del tratamiento. Estos resultados abren nuevas perspectivas para el diseño racional de estrategias eficaces y seguras para abordar la NPIO.

Todo abordaje experimental conlleva **limitaciones** inherentes que deben ser consideradas al interpretar los resultados y planificar estudios futuros. En este sentido, el presente trabajo presenta algunas restricciones que podrían haber influido en la profundidad del análisis. El uso de inhibidores específicos o de modelos genéticamente modificados (knock-out o transgénicos) hubiera permitido explorar con mayor precisión las cascadas moleculares implicadas en la neurotoxicidad y el dolor inducidos por quimioterapia, así como los mecanismos específicos mediados por resveratrol. Si bien se observó un efecto neuroprotector del resveratrol en animales machos, el estudio no incluyó un grupo de hembras tratadas con oxaliplatino y resveratrol en régimen preventivo, lo que impide confirmar su eficacia en ambos sexos. Asimismo, no se evaluó el papel de las hormonas sexuales en la modulación de los mecanismos neurotóxicos asociados al oxaliplatino, a pesar de que las respuestas neuronales y gliales pueden estar influenciadas por estrógenos, progesterona y andrógenos; por ello, sería relevante incorporar modelos experimentales con manipulación hormonal controlada. Finalmente, aunque el estudio clínico incluyó pacientes tratados con oxaliplatino, su diseño retrospectivo y la ausencia de instrumentos estandarizados validados o de biomarcadores diagnósticos específicos limitaron la solidez de los análisis. La integración futura de estas herramientas, junto con variables demográficas y genéticas, permitirá una caracterización más robusta de los factores asociados al riesgo y la severidad de la neuropatía, aspectos que se están abordando actualmente en estudios en curso.

5.2 Procesos neurotóxicos y alteraciones comportamentales inducidas por oxaliplatino

Nuestros resultados muestran que **la administración de oxaliplatino desencadenó cambios plásticos en diferentes actores y moduladores de la neurotransmisión nociceptiva, induciendo el desarrollo de hipersensibilidad y alodinia.**

Los animales expuestos a oxaliplatino mostraron una reducción significativa en el umbral de retirada ante estímulos mecánicos, así como un aumento significativo en el número de respuestas positivas ante la estimulación con frío, evidenciando el **desarrollo de hipersensibilidad mecánica y térmica fría**. Hipersensibilidad que, como ocurre en los pacientes, se manifestó desde el inicio del ciclo de quimioterapia y que se mantuvo tiempo después de su finalización. Como ya fue mencionado en secciones anteriores, los pacientes que reciben oxaliplatino pueden desarrollar una **neuropatía aguda** —durante o poco después de las primeras infusiones— y una **neuropatía crónica**, que se extiende a largo plazo. Ambas se caracterizan por la presencia de alteraciones sensitivas, incluyendo parestesias, disestesias, dolor espontáneo y dolor provocado por estímulos inocuos (alodinia) en las manos, los pies y la región orofaríngea (Miltenburg & Boogerd, 2014).

Así como la **hipersensibilidad** (una disminución significativa en el umbral) se observa con gran frecuencia en pacientes tratados con oxaliplatino, un porcentaje menor pero aún muy significativo, puede desarrollar **alodinia** (Bakogeorgos & Georgoulas, 2017; Miltenburg & Boogerd, 2014). En nuestro modelo observamos un comportamiento similar, con valores de respuesta indicativos de alodinia mecánica y alodinia al frío en el 40% y el 80% de los animales que recibieron el quimioterápico, respectivamente. Cabe destacar que la alodinia al frío resultó más prevalente que su contrapartida mecánica, como también se ha descrito en pacientes (Bakogeorgos & Georgoulas, 2017; Miltenburg & Boogerd, 2014). En estos, el dolor provocado por estímulos fríos —como el contacto con objetos de la heladera o el freezer, la ingesta de alimentos o bebidas frías, o la exposición a brisas frescas— constituye una manifestación distintiva de la NPIO.

Si bien no observamos en nuestros animales cambios evidentes en el pelaje ni la presencia de posturas antálgicas, no podemos descartar la presencia de **dolor espontáneo**, dado que esta dimensión del dolor es más difícil de objetivar en roedores y puede requerir pruebas complementarias específicas como la escala de expresión facial de dolor o registros de comportamiento espontáneo en ambientes no restrictivos (Navratilova & Porreca, 2014).

En este sentido, en los animales expuestos a oxaliplatino **detectamos una disminución de la distancia recorrida en el campo abierto en función del tiempo**, sin cambios significativos en la velocidad de desplazamiento o tiempo de inmovilidad. En estudios previos realizados en un modelo murino de neuropatía inducida por cisplatino no se detectaron cambios en la distancia total recorrida en el campo abierto (Becker et al., 2023), mientras que en ratones tratados con paclitaxel se observó una reducción de la distancia recorrida y la velocidad promedio (Osborne & Davis, 2022), sugiriendo que la afectación de la movilidad voluntaria depende del quimioterápico utilizado y, probablemente, de otras variables experimentales

como el número de aplicaciones y la dosis administrada, el tiempo transcurrido desde dicha aplicación, entre otros factores.

Los pacientes suelen manifestar **síntomas motores** tales como calambres y dificultades en tareas de motricidad fina (escribir, abrochar un botón) y de motricidad gruesa (caminar, subir escaleras), fenómenos frecuentemente relacionados con alteraciones en la coordinación sensorimotora (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017, 2019). En este contexto, detectamos en nuestros animales una **disminución en el consumo de alimento** que se tradujo en una **atenuación en la curva de crecimiento**, tanto durante el ciclo de quimioterapia como en el periodo posterior. Aunque no podemos descartar otras causas -por ejemplo, los pacientes describen la persistencia de un gusto amargo o metálico luego de recibir las infusiones, que se asocian con menor ingesta y pérdida de peso (Comeau et al., 2001)-, el menor consumo de alimento detectado en nuestros animales podría deberse a **alteraciones en la coordinación sensorimotora**. Las diversas tareas implicadas en la alimentación a partir de los pellets en la jaula -parase sobre las patas traseras, orientar el hocico hacia el lugar del depósito, alzar las patas delanteras para agarrar los pellets, mantenerlos firmes con ambas patas mientras realiza ajustes posturales, y finalmente trasladarlos a la boca para roer- requieren una integración precisa de movimientos de alcance, agarre y posición postural, que pueden verse dificultadas si existen disfunciones sensorimotoras. Finalmente, la menor ingesta y la consecuente desaceleración del crecimiento podrían estar indicando la presencia de **dolor espontáneo** (Tappe-Theodor & Kuner, 2014). De hecho, se ha reportado que en condiciones de dolor los animales reducen significativamente su ingesta (Negus et al., 2010).

Cabe destacar que nuestros resultados son consistentes con lo observado en modelos preclínicos que utilizan **otros quimioterápicos neurotóxicos**, como paclitaxel y vincristina, donde también se reporta el desarrollo de **dolor espontáneo y alodinia**, lo que sugiere que estos signos conductuales constituyen un fenotipo común de la neuropatía inducida por diversos agentes citotóxicos (Griffiths et al., 2018; Lynch et al., 2004; Smith et al., 2004).

Este patrón conductual común sugiere que, independientemente del agente quimioterápico utilizado, pueden activarse **mecanismos celulares y moleculares similares** responsables de la sensibilización nociceptiva. En este contexto, se ha propuesto que la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la neuroinflamación y el daño axonal podrían estar contribuyendo al daño neurotóxico inducido por diferentes agentes quimioterápicos (Doyle & Salvemini, 2021; Flatters et al., 2017; Starobova & Vetter, 2017).

Durante los últimos años, se ha postulado que las **deficiencias en el transporte axonal de mitocondrias** (en el caso de quimioterápicos que interrumpen dicho transporte como taxanos y derivados de la vinca) y las **disfunciones mitocondriales** (en el caso de quimioterápicos con acción directa sobre las mitocondrias como los derivados del platino y los taxanos) están vinculadas a la patogénesis de la NPIQ (Doyle & Salvemini, 2021; Flatters et al., 2017; Trekarichi & Flatters, 2019). En el caso de los compuestos basados en platino, estos se unen al ADN mitocondrial con alta afinidad, interfiriendo en su replicación y transcripción (Podratz et al., 2011). La disfunción mitocondrial compromete la producción de ATP, altera el equilibrio redox celular y promueve la acumulación de ROS, lo que favorece un entorno oxidante y proinflamatorio y altera la excitabilidad de las fibras aferentes primarias (Kang et al., 2021). De

esta forma, la toxicidad mitocondrial contribuye a la sensibilización de dichas neuronas y al desarrollo de dolor.

El SN es particularmente sensible al **daño asociado a estrés oxidativo** por diversas razones, entre las que se incluyen: el elevado consumo de oxígeno necesario para satisfacer sus altas demandas energéticas; la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, altamente vulnerables al ataque de radicales libres (peroxidación lipídica); los altos niveles intracelulares de calcio, que pueden inhibir la respiración mitocondrial y promover la producción de ROS/RNS; y la relativa debilidad de sus mecanismos de defensa antioxidante, caracterizados por niveles bajos de catalasa, glutatión peroxidasa y vitamina E, entre otros factores (Areti et al., 2014; Cobley et al., 2018; Shichiri, 2014). Si bien en condiciones fisiológicas las especies reactivas cumplen funciones biológicas relevantes, la generación excesiva de radicales libres constituye un factor clave en el daño neuronal (Jia et al., 2012; Ladak et al., 2019; Lopez et al., 2015; Toklu & Tümer, 2015).

Además de las mitocondrias, otras organelas celulares también contribuyen a la **producción de ROS/RNS**, incluyendo lisosomas y peroxisomas, en particular en células fagocíticas residentes o infiltrantes, como la microglía, los neutrófilos y los macrófagos (Birben et al., 2012; Jia et al., 2012; Toklu & Tümer, 2015). El exceso de especies reactivas agota las reservas antioxidantes y promueve procesos de oxidación/nitrosilación de proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos, lo que conlleva daño y disfunción celular (Birben et al., 2012; Kannan & Jain, 2000). La acumulación de ROS puede **afectar la funcionalidad de las propias mitocondrias**, generando un círculo vicioso de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Czerniczyniec et al., 2015; Was et al., 2022).

En los nervios y ganglios de los animales que recibieron oxaliplatino detectamos una disminución en la relación GSH/GSSG y elevados niveles de TBARS, **indicadores de condiciones de estrés y daño oxidativo** (Espinosa-Diez et al., 2015; Janero, 1990). Nuestros resultados están en línea con estudios previos que demostraron que oxaliplatino genera un aumento en los niveles de anión superóxido y de diversos procesos de **daño oxidativo** como la carbonilación de proteínas, en modelos *in vitro* e *in vivo* (Branca et al., 2021).

Es importante destacar que el desequilibrio oxidativo puede influir directamente en la excitabilidad de las neuronas aferentes primarias y su respuesta a estímulos inocuos y nocivos a través de la modulación de la actividad de receptores TRP. La oxidación dependiente de ROS de los **canales de potencial transitorio** TRPV1, TRPM8 y TRPA1, responsables de detectar estímulos térmicos, mecánicos y químicos, conduce a un aumento en su actividad, desencadenando hipersensibilidad (Basso & Altier, 2017; Yang et al., 2018). Además, la funcionalidad de las neuronas aferentes primarias puede verse directamente afectada por otros procesos derivados del daño mitocondrial inducido por el quimioterápico, como la reducción en la **producción de ATP**. En este sentido, las neuronas sensoriales son especialmente vulnerables debido a su alta demanda energética (Areti et al., 2014).

Por otra parte, la **activación de la vía intrínseca de apoptosis** también podría estar contribuyendo a la neurotoxicidad. Como se ha reportado en células tumorales, este fármaco promueve la traslocación de Bax a la membrana mitocondrial externa, favoreciendo la liberación de citocromo c y la subsecuente activación de caspasas (Arango et al., 2004).

Aunque en nuestro estudio no evaluamos directamente estos eventos apoptóticos, no se puede descartar que una activación subletal de esta vía pueda estar induciendo disfunción de las neuronas sensoriales.

En condiciones de toxicidad mitocondrial y estrés oxidativo se podrían activar **mecanismos protectores** o componentes de las vías de defensa antioxidante. En nuestros animales detectamos un incremento en la expresión del **factor de transcripción Nrf2**, principal regulador de la respuesta antioxidante (Nguyen et al., 2009; Qiang, 2013) y del funcionamiento mitocondrial (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015), así como de las **enzimas NQO-1 y HO-1**, con propiedades antioxidantes, detoxificantes y citoprotectoras (Araujo et al., 2012; Ross & Siegel, 2017). Estos hallazgos sugieren que las condiciones de estrés oxidativo activaron mecanismos antioxidantes compensatorios. Sin embargo, éstos resultaron insuficientes para neutralizar el estrés oxidativo sostenido probablemente derivado de la disfunción mitocondrial inducida por el quimioterápico.

Los niveles aumentados de especies reactivas y productos de daño oxidativo pueden inducir la activación de células gliales y células inflamatorias, a través de la activación directa del factor de transcripción NFκB, desencadenando **procesos neuroinflamatorios** (Lees et al., 2017). El **NFκB** regula la expresión de una amplia gama de moléculas pro-inflamatorias (Liu et al., 2017), incluidas citoquinas y quemoquinas, que pueden alterar la actividad de neuronas y de células gliales, contribuyendo así al desarrollo y mantenimiento del dolor persistente (Cairns et al., 2015; Ji et al., 2013). Entre los mediadores liberados por las células gliales activadas, las **citoquinas pro-inflamatorias IL1β y TNFα** juegan un papel clave en la comunicación glía-glía y glía-neurona y en la activación de las vías del dolor (Kawasaki et al., 2009). Curiosamente, la expresión de TNFα está regulada positivamente por NFκB, y la actividad de NFκB es inducida por TNFα (Liddell, 2017), participando en un circuito de retroalimentación positiva que exacerba la neuroinflamación.

Ambas citoquinas modulan la neurotransmisión del dolor mediante la activación de receptores específicos expresados a lo largo de la vía nociceptiva. El sistema de **TNFα** incluye dos formas de ligando y dos receptores que median efectos contrapuestos. Por un lado, el TNF soluble (solTNF) se une preferentemente a **TNFR1**, receptor expresado en la mayoría de los tipos celulares, que inicia vías inflamatorias y apoptóticas a través de la activación de NFκB y otros factores de transcripción, mediando además efectos deletéreos como la inhibición de la remielinización (Fischer et al., 2011; Papazian et al., 2021; Probert, 2015). Por otro lado, el TNF transmembrana (tmTNF) activa principalmente **TNFR2**, presente sobre todo en células inmunes, endoteliales y neuronas, lo cual promueve respuestas neuroprotectoras y favorece la remielinización mediante la vía PI3K/Akt (Fischer et al., 2011; Probert, 2015).

Por otro lado, el sistema de **IL-1β** incluye 2 receptores, el tipo 1 (IL-1RI) y el tipo 2 (IL-1RII). La señalización efectiva se ejerce exclusivamente a través de **IL-1RI**, ya que la unión a **IL-1RII** no desencadena señalización intracelular, motivo por el cual este último se considera un receptor señuelo (Ren & Torres, 2008). En el SN, IL-1β puede ser liberada por células endoteliales, macrófagos, células gliales -células de Schwann, microglía y astrocitos- e incluso neuronas (Perrin et al., 2005; Thacker et al., 2007). Por su parte, IL-1RI se expresa en células endoteliales, células gliales y neuronas (Aubé et al., 2014; Li et al., 2010).

Ambas citoquinas pueden además activar **receptores NMDA**, amplificando la neurotransmisión glutamatérgica y promoviendo un estado de neurotoxicidad progresiva que exacerba el dolor neuropático (Allan et al., 2005). En particular, IL-1 β , a través de la activación de IL1-RI, induce la fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA en neuronas espinales, potenciando la transmisión nociceptiva y la sensibilización central (Guo et al., 2007; Viviani et al., 2003; Zhang et al., 2007).

Las células gliales activadas también pueden liberar **citoquinas anti-inflamatorias** como **IL-10 y TGF β** , que actúan como reguladoras del proceso neuroinflamatorio contribuyendo de manera directa a la reducción del dolor neuropático (Chen et al., 2013; Ledebouer et al., 2007). En modelos de lesión traumática del nervio ciático, se ha demostrado que la **IL-10** producida por macrófagos y microglía suprime la liberación de TNF α , de IL-1 β y de otros mediadores pro-inflamatorios en los ganglios raquídeos, reduciendo la alodinia mecánica y térmica (Ji et al., 2016). Por su parte, **TGF- β** favorece la diferenciación de células T reguladoras y promueve la expresión de proteínas de reparación tisular (Chen, 2023). Además, inhibe la activación de microglía y astrocitos, reduciendo la liberación de TNF α e IL-1 β y favoreciendo un microambiente propicio para la recuperación neuronal (Buckwalter & Wyss-Coray, 2004; Ledebouer et al., 2002). Incluso se ha demostrado que la administración intratecal de TGF- β atenúa de forma significativa los comportamientos de dolor espontáneo y evocado (Echeverry et al., 2009). En nuestro modelo, si bien observamos una regulación positiva de TGF β en la médula espinal, el conjunto de nuestros resultados sugiere que este incremento no bastó para revertir el proceso de activación glial.

Como se ha descrito en otros modelos de lesión del SN, en los animales tratados con oxaliplatino detectamos un aumento en los niveles del ARNm de p65, el miembro más abundante de la familia de factores de transcripción **NF κ B**, así como en los ARNm que codifican para **IL1 β y TNF α** , tanto en los ganglios como en la médula. Estas observaciones coinciden con la detección, en ambas estructuras, de una mayor expresión de los genes que codifican para **GFAP e IBA-1**, marcadores de células satelitales y astrocitos y de macrófagos y células de la microglía, respectivamente. Los ensayos de inmunodetección de proteínas también mostraron un aumento en la señal inmunoreactiva, tanto en el asta dorsal completa como en las diferentes áreas funcionales (láminas I-II, III-IV y V-VI), indicando una activación glial generalizada en zonas de la médula espinal dorsal encargadas de modular y transmitir información sobre estímulos inocuos, nocivos y propioceptivos.

En condiciones basales, la inmunomarcación para GFAP en las células satelitales del ganglio y en los astrocitos de la médula es baja. Sin embargo, tras una injuria del SN ambos tipos celulares se activan y aumentan la expresión de GFAP. En las **células satelitales** se observa proliferación y engrosamiento (Andreeva et al., 2022; Donegan et al., 2013; Milosavljević et al., 2021). Los **astrocitos**, por su parte, también sufren cambios morfológicos característicos con hipertrofia celular, engrosamiento de sus somas y aumento en el número de ramificaciones (Hol & Pekny, 2015; Ji et al., 2018; Sofroniew & Vinters, 2009). Además, puede observarse una alteración en la arquitectura astrocitaria, con pérdida de los límites de dominio y una mayor superposición de sus prolongaciones, lo que sugiere una reorganización de la red glial como parte de la respuesta neuroinflamatoria (Hol & Pekny, 2015; Ji et al., 2018; Sofroniew & Vinters, 2009). Las **células de la microglía** espinales también experimentan una

activación morfológica en respuesta a diferentes tipos de injuria del SN (Kettenmann et al., 2011). Estos cambios morfológicos incluyen la retracción y engrosamiento de sus prolongaciones, hipertrofia del soma, y una transición progresiva hacia una morfología ameboide, asociada con funciones pro-inflamatorias y fagocíticas. Este cambio estructural se acompaña de un aumento en la inmunorreactividad para **IBA-1** y, en etapas más avanzadas, para **CD68**, reflejando la adquisición de un fenotipo activado con capacidad efectora (Davalos et al., 2005; Kettenmann et al., 2011; Salter & Stevens, 2017).

En un microambiente pro-inflamatorio, las células gliales liberan, además de las ya mencionadas citoquinas, diversos mediadores que participan en la **comunicación glía-glía y glía-neurona** (Afridi et al., 2020; Bernaus et al., 2020). Tal es el caso de moléculas como HMGB1 y NGF que tienen la capacidad de actuar sobre las neuronas sensitivas, promoviendo su sensibilización y contribuyendo a la cronificación del dolor (Mizumura & Murase, 2015; Wan et al., 2016).

HMGB1 es una proteína nuclear que actúa como alarmina cuando se libera al espacio extracelular tras lesión o inflamación. Una vez liberada, puede unirse a receptores como TLR4 y RAGE presentes en microglía, astrocitos y neuronas sensoriales, desencadenando la activación de las vías de NFκB y p38 MAPK y estimulando la síntesis de las ya mencionadas citoquinas proinflamatorias IL-1β y TNFα (Moraes et al., 2024). Se ha observado que el bloqueo farmacológico de TLR4 o RAGE reduce los niveles espinales de TNFα e IL-1β y atenúa la alodinia mecánica y térmica en estos modelos, lo que demuestra la relevancia funcional de estas interacciones ligando - receptor en la cronificación del dolor (Moraes et al., 2024). Además, el incremento en la expresión de RAGE que ha sido reportado en neuronas aferentes primarias, células satelitales del ganglio y células de Schwann tras una lesión del nervio, sugiere un circuito local de amplificación de la señal de HMGB1 (Feldman et al., 2012). Finalmente, en modelos de dolor neuropático inducido por paclitaxel, se ha reportado un incremento en los niveles de HMGB1 en la médula espinal durante las fases tempranas, atribuible sobre todo a su liberación por astrocitos y células de la microglía activadas, así como por neuronas lesionadas (Moraes et al., 2024). En línea con estos hallazgos previos, el aumento detectado en la expresión espinal de HMGB1 en nuestro modelo sugiere que esta alarmina podría estar contribuyendo a la hiperexcitabilidad neuronal y al mantenimiento del dolor neuropático en la NPIO.

Por su parte, el **NGF**, o factor de crecimiento nervioso, es una neurotrofina esencial para la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de neuronas sensoriales, con un papel clave en la homeostasis neuroinmune, los procesos de reparación tisular y la fisiopatología de procesos inflamatorios (Zhang et al., 2017). A nivel periférico es producido por células epiteliales, fibroblastos dérmicos, células endoteliales y células inmunes como mastocitos, linfocitos T y macrófagos (García-Domínguez, 2025; Mitsuma et al., 2004). En el SNP, las células de Schwann y los fibroblastos perineurales son fuentes importantes durante la regeneración axonal (He et al., 2022). En el SNC, los astrocitos, algunas poblaciones neuronales y, en menor medida los oligodendrocitos, pueden sintetizar NGF, especialmente en contextos de lesión o inflamación (García-Domínguez, 2025).

En nuestro modelo, los niveles aumentados de **NGF** en piel plantar y en ganglios raquídeos podrían estar induciendo sensibilización de las terminaciones nerviosas y amplificación de la señal nociceptiva. Se sabe que este factor neurotrófico actúa directamente sobre las fibras C que expresan el receptor de alta afinidad TrkA (Chao, 2003; Snider & McMahon, 1998), generando hipersensibilidad a estímulos mecánicos y térmicos mediante dos mecanismos temporales distintos. En primer lugar, el NGF producido por tejidos periféricos activa, a través de su interacción con TrkA, vías de señalización intracelular que potencian la función de proteínas de la terminal periférica del nociceptor, en particular los receptores TRP, generando un cambio rápido en la sensibilidad celular y conductual a estímulos externos (Chuang et al., 2001). Adicionalmente, el NGF es transportado retrógradamente al núcleo del nociceptor, donde promueve la expresión de proteínas pronociceptivas como la sustancia P, los receptores TRP y las subunidades del canal de sodio Nav1.8 (Chao, 2003; Ji et al., 2002), aumentando la excitabilidad del nociceptor y amplificando la respuesta inflamatoria neurogénica. La sensibilización inducida por NGF no se limita a acciones directas sobre las neuronas, sino que también involucra interacciones con células inmunes y fibroblastos (Minnone et al., 2017). Al promover la degranulación de mastocitos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF- α , IL-1 β e IL-6), genera un ciclo de retroalimentación positiva y perpetúa la sensibilización (Minnone et al., 2017).

Aunque inicialmente diseñada para proteger el SN, si la respuesta neuroinflamatoria no se regula adecuadamente, puede amplificarse y persistir, generando una sobreproducción de factores neurotóxicos que provocan daño e hiperactividad neuronal (Hong et al., 2016; Lyman et al., 2014). De hecho, la sobre-expresión de **ATF3** en los ganglios raquídeos de los animales tratados con oxaliplatino sugiere la existencia de daño neuronal. El ATF3, gen de respuesta temprana, es considerado un marcador molecular de células estresadas o lesionadas, con escasa expresión en tejidos normales. En particular, en neuronas aferentes primarias la expresión basal de ATF3 es muy baja, pero se induce rápidamente después de una lesión del nervio periférico (Nascimento et al., 2011; Tsujino et al., 2000).

Otro marcador que suele aumentar rápidamente en condiciones de daño nervioso es la **sustancia P**, un neuropéptido de la familia de las taquininas codificado por el gen Tac1, que se expresa predominantemente en neuronas aferentes primarias de pequeño diámetro, cuyas fibras terminan en las láminas I–II y V del asta dorsal (Polgár et al., 2020). Tras estímulos nocivos, estas neuronas liberan sustancia P tanto en las terminales periféricas —donde media vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular y reclutamiento de células inmunes (inflamación neurogénica)— como en las terminales centrales en el asta dorsal —donde se une al receptor de neuroquinina 1 (NK1), facilitando la transmisión nociceptiva (Zieglgänsberger, 2018). En condiciones de inflamación o daño nervioso, también las células gliales y otras poblaciones no neuronales pueden liberar sustancia P, como parte de un circuito neuroinmune. Además, se encuentra ampliamente demostrado que luego de injurias traumáticas del nervio periférico se produce un incremento en la expresión de sustancia P, no sólo en neuronas de pequeño tamaño, sino en neuronas medianas y grandes (C. M. Fu et al., 2013; Weissner et al., 2006). No obstante, en nuestro modelo de NPIO no detectamos variaciones en los niveles del ARNm que codifica para sustancia P, ni en ganglios dorsales ni en médula espinal. Nuestros resultados concuerdan con estudios *in vitro* que muestran que, a diferencia de paclitaxel, oxaliplatino no induce la liberación de sustancia P por neuronas aferentes primarias (Egashira, 2021).

En los animales que recibieron oxaliplatino también detectamos una sobre-expresión del protooncogén **c-fos**. Este gen se induce de forma inmediata tras el estímulo sináptico y, por lo tanto, se considera un marcador de activación neuronal (Gao & Ji, 2021). De manera similar, se ha descrito un aumento en la expresión de c-fos en neuronas de las láminas superficiales y profundas del asta dorsal, ya sea tras una estimulación nociva en animales *naïve* o tras una estimulación inocua en modelos de lesión nerviosa, representando así un marcador tanto de nocicepción como de sensibilización central (Gao & Ji, 2021), ampliamente utilizado.

En su conjunto, nuestros hallazgos respaldan la noción de que la neuropatía inducida por oxaliplatino no es consecuencia de un único evento tóxico, sino el resultado de un proceso dinámico y multidimensional, donde el daño mitocondrial, el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la hiperactividad neuronal se entrelazan y se refuerzan mutuamente, favoreciendo la sensibilización periférica y central y el desarrollo de dolor persistente.

5.3 Diferencias asociadas al sexo

Nuestros resultados muestran un **marcado dimorfismo sexual, tanto en el desarrollo de alodinia como en las alteraciones moleculares** desencadenadas por la administración de oxaliplatino.

Al evaluar simultáneamente grupos de animales de ambos sexos observamos que, en consonancia con nuestros resultados previos, los machos desarrollaron una marcada **hipersensibilidad mecánica y al frío** poco después de iniciado el ciclo de quimioterapia. Por su parte, las ratas hembra exhibieron un patrón de respuesta similar ante los estímulos mecánicos; sin embargo, la alodinia al frío fue significativamente más severa. Coincidentemente, se ha reportado que en ratones tratados con paclitaxel, las hembras desarrollaron alodinia al frío más intensa (Naji-Esfahani et al., 2016), mientras que no se hallaron diferencias sexuales en la alodinia (Hwang et al., 2012; Naji-Esfahani et al., 2016) ni en la hiperalgesia (Ferrari et al., 2020) mecánica. En sintonía con nuestros resultados, una dosis única de oxaliplatino provocó hiperalgesia mecánica de magnitud similar en machos y hembras (Staurengo-Ferrari et al., 2021). Al comparar ratones macho y hembra tratados con cisplatino —otro derivado del platino— no se observaron diferencias en el curso temporal ni en la intensidad de las respuestas ante estímulos mecánicos o térmicos fríos (Naji-Esfahani et al., 2016). Estos hallazgos sugieren que, en modelos preclínicos, sólo ciertos **comportamientos relacionados con el dolor** —y sólo frente a ciertos agentes quimioterápicos— **muestran dimorfismo sexual**.

Otros grupos de trabajo han abordado otros aspectos de las **diferencias asociadas al sexo en el dolor inducido por quimioterapia**. Ferrari y colaboradores han descrito un marcado dimorfismo sexual en los mecanismos neuroendócrinos involucrados en la exacerbación del dolor neuropático inducido por oxaliplatino (Staurengo-Ferrari et al., 2021) y paclitaxel (Ferrari et al., 2020) en condiciones de estrés. Por su parte, Ozdemir y colaboradores destacan que, dado que el oxaliplatino se transforma rápidamente en varios metabolitos que también son neurotóxicos, resulta fundamental considerar la contribución de diferencias relacionadas con el sexo en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos (Özdemir et al., 2022).

Los hallazgos obtenidos al evaluar el aspecto, el peso y el consumo de alimento de nuestros animales fueron similares en machos y hembras. Como señalamos en la sección anterior, la **ausencia de cambios notorios en el pelaje o la postura** no excluye la posibilidad de dolor espontáneo (Mogil, 2020). En estudios anteriores se ha descrito que los cuadros de neuropatía inducida por agentes como cisplatino o paclitaxel provocan retrasos en el crecimiento corporal, sin detectarse alteraciones en la postura o el pelaje (Authier et al., 2000, 2003). En nuestros animales **observamos una clara reducción de la tasa de crecimiento en machos y hembras**. Este fenómeno puede interpretarse como un marcador indirecto de dolor o malestar, o puede estar relacionado con la disminución en la ingesta, que observamos en ambos sexos.

En nuestro modelo también detectamos algunas **diferencias asociadas al sexo en la afectación de parámetros relacionados a locomoción**. Aunque no surgieron diferencias significativas al comparar animales de ambos sexos expuestos al quimioterápico, así como tampoco al comparar hembras control y hembras tratadas con oxaliplatino, sí se detectó en las hembras una mayor afectación de dichos parámetros en función del tiempo. En efecto, mientras que en los machos sólo la distancia recorrida se redujo significativamente tras el ciclo de quimioterapia, en las hembras los 3 parámetros – distancia, velocidad y tiempo de inmovilidad- se vieron afectados tanto durante como después del período de administración, sugiriendo una mayor vulnerabilidad a las alteraciones locomotoras inducidas por el fármaco.

No hemos hallado en la literatura reportes previos del estudio de diferencias sexuales en la afectación de parámetros locomotores luego de la exposición a oxaliplatino. En un modelo de neuropatía inducida por paclitaxel no se identificaron cambios en dichos parámetros ni en machos ni en hembras (Di Marino et al., 2024). Lo mismo ocurrió en un modelo de lesión traumática del nervio periférico (Boullon et al., 2021). Independientemente del tipo de lesión, existen pocos estudios que hayan comparado distancia recorrida, velocidad promedio y tiempo de inmovilidad en animales de ambos sexos, lo cual refuerza la necesidad de ampliar dichas evaluaciones conductuales. En este contexto, es relevante mencionar, que **existe un sesgo histórico y sistemático en la investigación preclínica del dolor**: hasta el año 2015 tan solo el 4% de los estudios publicados en la revista *Pain* usaron animales de ambos sexos, mientras que cerca del 79% incluyeron únicamente machos (Mogil, 2020). Si bien esta tendencia comenzó a revertirse y entre 2015 y 2019 el porcentaje de trabajos que utilizó únicamente machos se redujo al 50% (Mogil, 2020), esta desviación ha afectado y sigue afectando la forma en que se interpretan los resultados conductuales, incluidos aquellos relacionados con la locomoción, y refuerza la necesidad de seguir incorporando análisis diferenciados por sexo en modelos animales.

De hecho, en los últimos años, se ha impulsado fuertemente la **inclusión de sujetos de ambos sexos en estudios experimentales y clínicos de dolor**, convirtiéndose en un requisito prácticamente obligatorio (Mogil, 2020). La evidencia muestra que las disparidades sexuales caracterizan la experiencia del dolor y la prevalencia de varias condiciones de dolor crónico en la población (Casale et al., 2021; Gregus et al., 2021; Sorge & Strath, 2018). El género desempeña un papel crítico en la modulación de la experiencia del dolor: los hombres y las mujeres experimentan el dolor de diferentes maneras e incluso responden de manera diferencial a ciertos medicamentos analgésicos (Casale et al., 2021; Gregus et al., 2021; Mogil,

2020). En el contexto de la **neuropatía inducida por quimioterapia**, recién se han comenzado a documentar las **diferencias de género** en la incidencia de dolor persistente. La evidencia disponible es aún heterogénea: algunos estudios no muestran diferencias, mientras que otros indican mayor vulnerabilidad en mujeres. En apartados posteriores discutiremos dichos hallazgos, junto con nuestras propias observaciones.

En cuanto a los **mecanismos celulares y moleculares** que podrían subyacer a las **diferencias comportamentales detectadas**, nuestros resultados sugieren que tanto la expresión de receptores involucrados en la detección de estímulos, como la actividad de sistemas endógenos de modulación de dolor, como la contribución de células gliales a los procesos neuroinflamatorios podrían tener una modulación diferencial según el sexo luego de la exposición a oxaliplatino. En los próximos párrafos se hará referencia a estos procesos.

En nuestros animales detectamos un **aumento en la expresión de TRPV1, TRPM8 y TRPA1** en los ganglios raquídeos de machos y hembras. Sin embargo, mientras que la magnitud del aumento de TRPV1 y TRPA1 fue similar en ambos sexos, los niveles de expresión de TRPM8 fueron más elevados en hembras, coincidiendo con la mayor sensibilidad al frío detectada en este grupo. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el dimorfismo observado en la respuesta conductual podría estar mediado, al menos en parte, por una sobreexpresión diferencial de TRPM8 en el SNP luego de la exposición al quimioterápico.

Los **canales TRP**, conocidos por su participación en la detección y transducción de estímulos térmicos, químicos y mecánicos (Dai, 2016; Marwaha et al., 2016), han sido ampliamente **implicados en la fisiopatología del dolor neuropático** (Basso & Altier, 2017). En condiciones fisiológicas TRPV1 participa en la respuesta a calor nocivo, TRPM8 es activado por estímulos fríos inocuos y TRPA1 responde a frío nocivo. En condiciones de sensibilización de los nociceptores el umbral de activación de estos canales puede modificarse y contribuir al desarrollo de alodinia e hiperalgesia (Basso & Altier, 2017; Patil et al., 2013).

En nuestro modelo, el incremento observado en la expresión de los **canales TRP** sugiere su **participación en la hipersensibilidad mecánica y térmica inducida por oxaliplatino**, coincidiendo con los resultados obtenidos en estudios previos en animales *knock out* (Colburn et al., 2007; Zhao et al., 2012). En efecto, en ratones deficientes en TRPA1 se redujeron significativamente los comportamientos nociceptivos evocados por estímulos mecánicos y fríos tras la administración aguda de oxaliplatino (Zhao et al., 2012), mientras que en ratones *knock out* para el gen *trpm8* se observaron respuestas nocifensivas reducidas a estímulos fríos (Colburn et al., 2007). Nuestras observaciones también se correlacionan con estudios inmunohistoquímicos previos realizados por Chukyo y colaboradores en ratas macho. Utilizando inmunofluorescencia de doble marcaje, los autores demostraron un aumento en la coexpresión de **TRPV1 y TRPA1** en neuronas aferentes primarias de pequeño tamaño positivas para isolectina B4, así como un incremento robusto en la colocalización de **TRPM8** y neurofilamento 200 en neuronas de tamaño mediano, cuatro días después de recibir una dosis única de oxaliplatino (Chukyo et al., 2018). Nuestro estudio confirma que la regulación positiva de los canales TRP inducida por la quimioterapia también ocurre en animales hembra, y no solo en ganglios periféricos sino también en la médula espinal lumbar.

Se ha demostrado que la expresión de TRPV1 se induce en la médula tras la administración intraplantar de adyuvante completo de Freund o como consecuencia de la constricción crónica del nervio ciático (Abooj et al., 2016). No obstante, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evidencia un **aumento en la expresión de TRPV1 y TRPM8 en la médula** después de la administración de un agente quimioterápico neurotóxico. Se reconoce que los canales TRP espinales, presentes tanto en las terminales centrales de las neuronas aferentes primarias como en las neuronas locales del asta dorsal, desempeñan un papel fundamental en la exacerbación del dolor (Choi et al., 1994; Patapoutian et al., 2009). Por lo tanto, es probable que los mecanismos centrales mediados por TRP contribuyan a la hiperactividad de las vías nociceptivas en condiciones de neurotoxicidad por fármacos quimioterápicos, reforzando la idea de que estos canales constituyen blancos terapéuticos prometedores para el desarrollo de farmacoterapias eficaces contra el dolor inducido por oxaliplatino.

Además de las neuronas, **las células gliales también expresan canales TRP funcionales** que cumplen roles definidos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Chakraborty & Goswami, 2022; Shin et al., 2020; Shirakawa & Kaneko, 2018; Verkhatsky et al., 2013) y que contribuyen en forma directa al desarrollo de dolor neuropático (Shin et al., 2020). Dado que en nuestro proyecto no realizamos estudios de inmunomarcación, no podemos definir si el incremento en la expresión de TRPs ocurrió en neuronas, en células gliales o en ambas poblaciones celulares. Cabe mencionar que las células gliales activadas pueden también contribuir a la activación de canales TRP expresados en nociceptores, a través de la liberación de mediadores pro-inflamatorios (Hiura & Nakagawa, 2012; Luo et al., 2021). Además, se ha demostrado que **tanto la expresión como la actividad de los canales TRP en neuronas sensoriales pueden ser moduladas por hormonas gonadales** en condiciones basales (Enciso-Pablo et al., 2021) y en ciertas condiciones de dolor persistente (Artero-Morales et al., 2018). El estradiol (Gkika et al., 2020; Payrits et al., 2017), la progesterona (Ortíz-Rentería et al., 2018) y la testosterona (Gkika et al., 2020) regulan la expresión y/o la actividad de TRPs a través de mecanismos tanto genómicos como no genómicos, lo cual refleja la gran complejidad de la regulación hormonal sobre la función de estos canales.

Otro sistema que muestra cierto **dimorfismo sexual** en los cambios adaptativos que experimenta luego de la exposición a oxaliplatino es el **sistema endocannabinoide**. El SEC es un sistema endógeno con un papel fundamental en la modulación del dolor nociceptivo y patológico (Finn et al., 2021; Guindon & Hohmann, 2009; Maldonado et al., 2016; Woodhams et al., 2015). Está compuesto por ligandos endógenos -siendo los principales 2AG y AEA-, las enzimas involucradas en su síntesis y degradación, y los receptores CB1 y CB2 (Finn et al., 2021; Maldonado et al., 2016). Tanto CB1 como CB2 están acoplados a proteínas G inhibitorias; el receptor CB1 se expresa en alta proporción en neuronas, mientras que el receptor CB2 se expresa en mayor medida en células gliales e inmunes (Blanton et al., 2019; Finn et al., 2021; Maldonado et al., 2016).

Los componentes del SEC se expresan a lo largo de la vía nociceptiva: en neuronas aferentes primarias, en el asta dorsal de la médula espinal y en múltiples regiones cerebrales asociadas con la percepción y modulación del dolor (Finn et al., 2021; Maldonado et al., 2016). Los endocannabinoides, sintetizados en la neurona postsináptica, actúan de manera retrógrada activando los receptores localizados en terminales presinápticas, con un efecto inhibitorio neto sobre la excitabilidad neuronal a través de diversos mecanismos (Blanton et al., 2019;

Finn et al., 2021). Además, la atenuación de los procesos neuroinflamatorios mediada por CB2 también contribuye al efecto antinociceptivo general (Finn et al., 2021).

Nuestros resultados muestran **cambios** hasta ahora no reportados **en la expresión de los receptores CB1 y CB2 y de los ligandos endógenos 2AG y AEA** en los ganglios lumbares luego de la exposición a oxaliplatino. También demostramos la existencia de cierto **dimorfismo sexual** en la modulación del SEC que podría estar contribuyendo de manera diferencial a la fisiopatología de la hipersensibilidad y el dolor en machos y hembras. Luego de la administración de oxaliplatino, en los machos se detectó una disminución en los niveles de 2AG, mientras que en las hembras se observó una reducción específica de AEA. Esta divergencia podría tener implicancias funcionales relevantes, considerando que **AEA y 2AG** no solo interactúan en forma diferencial con receptores cannabinoides, sino que también modulan de forma distinta la actividad de canales TRP (Guindon & Hohmann, 2009). Por otra parte, si bien los niveles de los receptores **CB1 y CB2** aumentaron en ganglios de animales de ambos sexos, la magnitud del incremento fue marcadamente mayor en hembras.

En estudios previos se ha reportado que **el SEC experimenta una fuerte modulación en respuesta a distintos tipos de injurias del SN** que conducen al desarrollo de dolor neuropático (García-Ovejero et al., 2009; Guindon & Hohmann, 2009; Masocha, 2018; Sagar et al., 2012). Los componentes específicos del SEC afectados, así como la magnitud y localización de estos cambios, parecen depender del tipo de lesión. Mientras que la expresión del receptor CB1 se vio aumentada en las láminas superficiales del asta dorsal en ratas con lesión crónica por constricción del nervio ciático, apareció disminuida en la sustancia gris periacueductal, un centro supraspinal involucrado en la modulación descendente del dolor (Lim et al., 2003). Por el contrario, en condiciones de neurotoxicidad inducida por cisplatino no se detectaron cambios en la expresión de CB1 ni en ganglios ni en médula (Guindon et al., 2013), mientras que su expresión espinal aumentó significativamente luego de una contusión medular (García-Ovejero et al., 2009). También se han observado cambios importantes en la expresión de diversas enzimas involucradas en la síntesis y degradación de endocannabinoides, 7 días después de una lesión medular (García-Ovejero et al., 2009), mientras que los cambios detectados fueron mínimos en animales tratados con cisplatino, 16 días después de la administración del fármaco (Guindon et al., 2013). Dado que los endocannabinoides son mediadores lipídicos producidos "a demanda", sus niveles están directamente regulados por la expresión y/o actividad de las enzimas de síntesis y degradación (Maldonado et al., 2016). Estos hallazgos sugieren que tanto el tipo de lesión como el tiempo transcurrido desde la misma podrían influir en las alteraciones del SEC.

Existe evidencia de **dimorfismo sexual en la expresión y actividad del SEC en el SN** en condiciones basales (Blanton et al., 2021; Craft et al., 2013). Por ejemplo, la amígdala de ratas macho *naive* contiene niveles más altos de 2AG y AEA, mientras que las hembras presentan mayores concentraciones de las enzimas que catalizan la degradación de endocannabinoides (Krebs-Kraft et al., 2010). Por su parte, en ratas macho control hay concentraciones más altas de 2AG en la sustancia gris periacueductal, mientras que en las hembras son mayores los niveles de 2AG en el nervio y el núcleo caudal del trigémino, y de AEA en la sustancia gris, la corteza motora y el nervio trigémino (Levine et al., 2021). Por el contrario, una publicación reciente de Boullon y colaboradores no encontró diferencias en los niveles espinales y supraspinales de endocannabinoides en ratas con dolor neuropático inducido por lesión del

nervio ciático, ni diferencias entre machos y hembras (Boullon et al., 2021). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que demuestra diferencias sexuales en los cambios inducidos por oxaliplatino en los niveles de los dos principales endocannabinoides en los ganglios lumbares, lo que sugiere una **modulación sexualmente dimórfica del SEC en condiciones de neurotoxicidad**.

También detectamos **diferencias asociadas al sexo en los cambios inducidos por oxaliplatino en la expresión de los receptores cannabinoides**: la magnitud del aumento en CB1 y CB2 fue el doble en los ganglios de hembras. Así como ocurre en otros modelos de dolor neuropático (Sagar et al., 2012), el aumento de CB1 y CB2 podría representar un mecanismo endógeno compensatorio destinado a contrarrestar la disminución de endocannabinoides, la hiperactividad neuronal y el dolor. Además, niveles aumentados de receptores cannabinoides podrían generar un microambiente favorable para la analgesia inducida por cannabinoides.

De hecho, el **rol de los cannabinoides en el tratamiento para el dolor neuropático inducido por quimioterapia** está siendo ampliamente investigado en estudios preclínicos y clínicos (Aviram et al., 2022; Blanton et al., 2019; Cavaletti et al., 2021; Soriano et al., 2025; Ward et al., 2021). En este contexto, la observación de cambios dependientes del sexo en el SEC resulta especialmente relevante, no solo porque machos y hembras experimentan dolor de manera diferente, sino también porque pueden responder de manera diferencial a los tratamientos analgésicos (Casale et al., 2021; Gregus et al., 2021; Mogil, 2020). En efecto, ya se ha reportado cierto **dimorfismo sexual en la farmacología de los cannabinoides** (Blanton et al., 2021; Cooper & Craft, 2018; Craft et al., 2013). Estos parecen ser más potentes y, en ocasiones, más eficaces en animales hembra, sumado al hecho que las mujeres tienden a mostrar mayor sensibilidad tanto a los efectos beneficiosos como a los efectos adversos de los cannabinoides exógenos (Cooper & Craft, 2018; Craft et al., 2013). Estas diferencias sexuales en los beneficios terapéuticos y los riesgos asociados al cannabis medicinal se han atribuido a una expresión, función y modulación sexualmente dimórfica del SEC a lo largo del SN (Blanton et al., 2021; Craft et al., 2013). Nuestros resultados actuales, en particular el aumento más marcado de CB1 y CB2 en los ganglios de hembras, respaldan esta hipótesis.

Si se tiene en cuenta que la comprensión incompleta de los eventos patogénicos que inducen los antineoplásicos neurotóxicos representa un obstáculo clave para identificar tratamientos efectivos, nuestros datos, al ofrecer un conocimiento más profundo sobre la biología del SEC en condiciones de neurotoxicidad, podrían contribuir al **diseño de medicamentos a base de cannabinoides que sean eficaces y seguros para el tratamiento de la NPIQ y el dolor asociado**, tanto en pacientes varones como mujeres. En particular, la modulación farmacológica selectiva del SEC a nivel periférico, ya sea mediante la inhibición de las enzimas que metabolizan a los endocannabinoides o mediante la activación de los receptores CB1 y CB2, ha demostrado aliviar la alodinia en modelos experimentales de dolor inducido por quimioterapia (Khasabova et al., 2014; Mulpuri et al., 2018; Saliba et al., 2018; Slivicki et al., 2018; Thomas et al., 2020) y podría resultar beneficiosa al evitar los efectos adversos mediados por acciones en el SNC. No obstante, a pesar del creciente interés, aún se requiere mayor evidencia sobre el rol de los cannabinoides exógenos en la prevención y/o tratamiento del dolor inducido por quimioterapia (Cavaletti et al., 2021; Ward et al., 2021).

En relación con los mecanismos neuroinmunes, nuestros resultados revelan una **activación diferencial de células gliales y de células inmunes en función del sexo**, tanto a nivel periférico como central. En las **hembras** observamos una **mayor sobreexpresión de IBA-1 en los ganglios** de la raíz dorsal, lo cual podría reflejar una mayor activación o infiltración de macrófagos (Ton et al., 2013). Este hallazgo concuerda con estudios que indican que en hembras la modulación del dolor depende en mayor medida de mecanismos inmunes adaptativos, incluyendo células mieloides y linfocitos T (Hartlehnert et al., 2017; Sorge et al., 2015). Por el contrario, **no se detectaron cambios en la expresión de IBA-1 a nivel espinal**, lo que coincide con estudios que muestran que la microglía espinal, aunque se activa tras una lesión, no constituye el principal mediador de la sensibilización central en las hembras, a diferencia de lo observado en machos (Guo et al., 2019; Mapplebeck et al., 2018).

A su vez, nuestros hallazgos muestran un **incremento más marcado de los niveles de ARNm de GFAP en los ganglios de los machos**, lo cual podría interpretarse como una mayor activación de células gliales periféricas en este sexo. Si bien se ha reportado el aumento de GFAP en células satelitales en diversos modelos de daño del SN, no hemos identificado ninguna comparación directa entre machos y hembras. Por ejemplo, en ratones macho sometidos a lesión traumática del nervio se observó un incremento significativo de la proporción de células satelitales positivas para GFAP mediante inmunofluorescencia (Konnova et al., 2023). De forma similar, en ratas Sprague-Dawley hembras con lesión del disco intervertebral lumbar se registró un marcado aumento de la inmunorreactividad para GFAP en los ganglios L4–L5 (Y. Li et al., 2011). No obstante, no se ha comparado la magnitud de esta activación glial entre sexos, lo que subraya la novedad de nuestros hallazgos.

Otro marcador que mostró un perfil diferencial de modulación en función del sexo fue **HMGB1**, con un **incremento mayor en los ganglios de machos**. Interesantemente, si bien en un modelo murino de dolor por artritis se observó un incremento de HMGB1 en el tejido articular tanto de machos como de hembras y, además, su administración intraarticular provocó dolor en ambos sexos, su neutralización periférica revirtió la hipersensibilidad mecánica únicamente en machos mostrando un claro dimorfismo sexual (Rudjito et al., 2020).

Se ha propuesto que **el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático en machos y hembras podría involucrar vías celulares distintas**. Por ejemplo, en machos, la comunicación entre microglía y neuronas espinales a través de la vía P2X4R–p38MAPK–BDNF desempeña un papel central en la hipersensibilidad (Jin et al., 2003; Tsuda et al., 2003). La activación del receptor microglial P2X4R, desencadenada por el ATP liberado por neuronas, induce la liberación de BDNF, facilitando la sensibilización central (Barcelon et al., 2023). De hecho, la inhibición farmacológica de P2X4R, p38MAPK o BDNF revierte la alodinia inducida por lesión nerviosa únicamente en machos, sin efecto en hembras (Barcelon et al., 2023). Además, el factor estimulante de colonias 1 (CSF1) promueve la activación microglial en la médula de machos, mientras que, en hembras, este mismo estímulo induce la infiltración de linfocitos T reguladores, capaces de suprimir la activación microglial (Coraggio et al., 2018; Yu et al., 2021). En hembras, la sensibilización al dolor tras una lesión nerviosa parece depender en mayor medida de la activación de células inmunes, particularmente macrófagos y linfocitos T (Gregus et al., 2021). En modelos experimentales en los que se inactiva a la microglía, la alodinia persiste únicamente en las hembras; mientras que, al suprimir la respuesta de linfocitos T, se logra analgesia (Barcelon et al., 2023). Estos datos refuerzan la noción de que

la microglía desempeña un rol esencial en la sensibilización al dolor en machos, mientras que en hembras predomina un eje regulador mediado por células del sistema inmune adaptativo.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la necesidad de considerar al sexo como una variable biológica relevante en el estudio del dolor neuropático inducido por quimioterapia. La identificación de patrones diferenciales en la expresión de canales iónicos, componentes del sistema endocannabinoide, y marcadores de daño y activación glial, aporta información valiosa para el diseño de estrategias terapéuticas y la aplicación de intervenciones farmacológicas personalizadas en función del sexo. El reconocimiento de que machos y hembras no sólo expresan distintos síntomas, sino que activan rutas celulares y moleculares diferentes, resalta la importancia de desarrollar tratamientos adaptados al sexo del paciente para reducir los efectos adversos de la quimioterapia.

5.4 Potencial neuroprotector del resveratrol

Los resultados obtenidos en el marco del proyecto III demostraron, por primera vez, que **la administración oral, temprana y sostenida de resveratrol es capaz de prevenir la hipersensibilidad y la alodinia** inducidas por oxaliplatino.

Los animales que recibieron oxaliplatino y resveratrol no desarrollaron hipersensibilidad ni alodinia a estímulos mecánicos ni térmicos fríos. En este sentido, la administración de resveratrol antes, durante y después de la quimioterapia demostró ser efectiva para prevenir las conductas de dolor inducidas por el antineoplásico. En la última década, la suplementación con **resveratrol ha demostrado atenuar las conductas de dolor en modelos experimentales de otros tipos de neuropatías**, incluyendo neuropatía diabética (Kumar et al., 2013), lesión del nervio ciático por constricción crónica (Tao et al., 2016) y neuralgia del trigémino (Yang et al., 2016). El polifenol también resultó efectivo en atenuar el dolor en un modelo de cáncer óseo (Lux et al., 2019). A nivel clínico, en un estudio prospectivo que incluyó pacientes con endometriosis, la administración de resveratrol redujo significativamente los puntajes de dolor y resolvió la dismenorrea y el dolor pélvico en el 82% de las pacientes tratadas (Maia et al., 2012). Estos resultados respaldan el potencial del resveratrol para el control de la inflamación y el dolor. Sin embargo, hasta el momento, sus efectos beneficiosos no habían sido demostrados en un modelo de dolor neuropático inducido por oxaliplatino.

En este contexto, resulta importante destacar que **la neuropatía inducida por quimioterapia** presenta una característica particular: **es potencialmente prevenible**. La exposición a los fármacos antineoplásicos es un evento planificado, a diferencia de otras lesiones del SN (Loprinzi et al., 2020). Por otra parte, en los últimos años, las guías internacionales de salud han enfatizado la importancia de la prevención del dolor como una estrategia central en el manejo de los pacientes. Esta prioridad refleja un cambio de paradigma en el abordaje del dolor, orientado no solo a tratarlo una vez establecido, sino también a prevenir su aparición y progresión (Fricton, 2015). En este contexto, la IASP declaró al 2020 como el “Año Global para la Prevención del Dolor”, con el objetivo de sensibilizar a la comunidad global a través de la difusión de estrategias y recursos para la prevención del dolor en diferentes poblaciones. De este modo, se buscó aumentar la conciencia sobre la necesidad de implementar medidas

preventivas efectivas, promover investigaciones en este campo y fomentar políticas de salud pública tendientes a minimizar el impacto del dolor a fin de mejorar la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo. En este contexto, la **identificación de estrategias preventivas**, como la administración de resveratrol descrita en este proyecto, adquiere una relevancia significativa, ya que podría contribuir de manera sustancial a mejorar la calidad de vida a largo plazo de los pacientes oncológicos.

Lamentablemente, cuando **la administración del polifenol se realizó en forma tardía no logró revertir la alodinia ya establecida**. Aunque no se profundizó en los mecanismos subyacentes, es posible que, una vez instaurado el daño en el SN, su reversión —y, por ende, la reducción de la sintomatología asociada— fuera poco factible o limitada. Por lo tanto, una estrategia a evaluar sería iniciar el tratamiento con resveratrol ni bien se detectan los primeros signos de hipersensibilidad, con el objeto de frenar o mitigar la progresión de la sintomatología. Como era esperable, el tratamiento preventivo con el polifenol no indujo cambios en la postura ni en el pelaje. Tampoco modificó parámetros asociados a locomoción. Sin embargo, la **administración temprana de resveratrol logró contrarrestar la atenuación en el crecimiento corporal** observada en los animales expuestos al agente antineoplásico, un efecto previamente documentado en modelos experimentales de caquexia asociada al cáncer (Tisdale, 2005; Wyke et al., 2004). Nuestros hallazgos indican que **este efecto no se debe a un aumento en el consumo de alimento**, ya que no se observaron diferencias en la ingesta, sugiriendo que el mantenimiento de la curva de crecimiento corporal podría estar relacionado con otros mecanismos. En estudios recientes se ha demostrado que el resveratrol mejora la salud intestinal y la capacidad digestiva al aumentar la actividad de enzimas digestivas, ampliar la superficie de las vellosidades intestinales y modular positivamente la microbiota intestinal (Meng et al., 2023; Yang et al., 2022; Zhuang et al., 2021). Estos efectos podrían contribuir a una mejor absorción de nutrientes y, en consecuencia, al mantenimiento de la tasa de crecimiento corporal, incluso en presencia de tratamientos quimioterápicos que suelen comprometer la salud intestinal.

En relación al **potencial traslacional** de nuestros hallazgos, es importante señalar que el resveratrol, ampliamente utilizado como suplemento dietario por sus propiedades antioxidantes, ha despertado un creciente interés científico en los últimos años debido a su prometedor potencial farmacológico (Berman et al., 2017; Singh et al., 2019). Las propiedades farmacocinéticas, el perfil de seguridad y la eficacia del resveratrol han sido evaluados en más de 250 ensayos clínicos, en los cuales se ha reportado que este polifenol ejerce múltiples **efectos beneficiosos** en pacientes con diversas patologías —desde diabetes y otros síndromes metabólicos hasta alergias y cáncer—, gracias a su capacidad para modular múltiples vías de comunicación intracelular (Berman et al., 2017; Singh et al., 2019).

Una vez demostrada la capacidad del resveratrol para prevenir la neuropatía y el dolor asociados, un aspecto crucial a evaluar eran sus **efectos sobre el desarrollo tumoral**. En los últimos años, el resveratrol ha sido propuesto como un agente quimioprotector, con efectos sinérgico en tratamientos antineoplásicos (Cocetta et al., 2021). En efecto, este polifenol no solo podría potenciar los efectos antitumorales de la quimioterapia, sino también mitigar los efectos adversos asociados (Berman et al., 2017; Xiao et al., 2019). Diversos estudios han demostrado que la combinación de resveratrol con oxaliplatino mejora las acciones antiproliferativas y favorece la apoptosis en líneas celulares de tumores de colon (Nalini &

Uthayashanker, 2016), páncreas (Cui et al., 2010) y ovario (Nessa et al., 2012). Además, la suplementación con resveratrol ha mostrado beneficios en pacientes con tumores de colon, próstata y mama (Berman et al., 2017; Singh et al., 2019).

En nuestro modelo murino, los resultados no evidenciaron una potenciación de los efectos antitumorales del oxaliplatino al combinarlo con resveratrol; sin embargo, se observó claramente que **el polifenol no interfiere con dichos efectos**, lo que sugiere la seguridad de su uso concomitante. Estos hallazgos respaldan la posibilidad de utilizar resveratrol como adyuvante en terapias antineoplásicas, aunque se requieren estudios adicionales para confirmar su eficacia sinérgica en diferentes contextos tumorales. Considerando los efectos neuroprotectores y antialodínicos observados en este estudio, las **terapias combinadas con oxaliplatino y resveratrol** podrían ofrecer una estrategia innovadora para el tratamiento del cáncer, abordando tanto la eficacia antitumoral como la mitigación de efectos secundarios asociados a la quimioterapia.

De hecho, nuestro estudio muestra que **el resveratrol es capaz de estimular los mecanismos de defensa antioxidante y reducir los procesos neuroinflamatorios** en el nervio ciático, los ganglios de la raíz dorsal y la médula espinal lumbar. Estas acciones previenen o atenúan el daño neurotóxico inducido por el oxaliplatino, resultando en una menor activación de los circuitos nociceptivos. En particular, nuestros resultados muestran de manera clara que la administración oral de **resveratrol** fue capaz de contrarrestar el aumento en los niveles de TBARS inducido por oxaliplatino, al mismo tiempo que promovió un aumento significativo en el contenido de glutatión total y restauró la relación GSH/GSSG, indicando **un incremento en las reservas antioxidantes y una reducción de la peroxidación lipídica**.

En concordancia con nuestros hallazgos a nivel del SNP, diversos estudios han demostrado que **el resveratrol ejerce potentes efectos antioxidantes tras lesiones que afectan al SNC**. En un modelo de isquemia-reperfusión, una única dosis del polifenol administrada de forma inmediata después del trauma logró reducir significativamente los niveles de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), enzima clave en la síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina (Fu et al., 2018). Además, el tratamiento con resveratrol contrarrestó la liberación de radicales libres inducida por la lesión y promovió un aumento de las defensas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas. Entre ellas, se destacan: la superóxido dismutasa, que neutraliza el anión superóxido; la catalasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2); y el glutatión, considerado el principal regulador del estado redox celular (Fu et al., 2018). Estos efectos antioxidantes también fueron evidentes en un modelo experimental de lesión medular por compresión. En este caso, la administración de una única dosis de resveratrol, una hora después de la lesión, indujo un aumento significativo de la capacidad antioxidante total —medida que refleja la cantidad de radicales libres neutralizados— tanto en suero como en tejido medular (Çiftçi et al., 2016). Asimismo, se observó un incremento en la actividad de la paraoxonasa-1, una esterase asociada a las lipoproteínas de alta densidad que ejerce funciones citoprotectoras mediante la escisión de aductos derivados de la peroxidación de fosfolípidos (Çiftçi et al., 2016).

Además, nuestros resultados indican que la suplementación con resveratrol resulta en menores niveles de inmunomarcación de GFAP en ganglios y médula espinal, así como de IBA-1 en la médula, lo que sugiere una atenuación en la activación de células satelitales en los

ganglios y de astrocitos y microglía en la médula espinal. Además, observamos menores niveles de expresión de NFκB y TNFα en ambas estructuras, lo que respalda la **capacidad del resveratrol para prevenir los procesos neuroinflamatorios inducidos por el oxaliplatino** a lo largo de la vía nociceptiva.

Estos hallazgos coinciden con estudios previos que demuestran los **efectos anti-inflamatorios del resveratrol en diversos modelos de dolor neuropático**. En un modelo de neuropatía diabética la administración de resveratrol redujo los marcadores oxidativos e inflamatorios en el nervio ciático (Kumar & Sharma, 2010). En un modelo de lesión por constricción crónica del nervio trigémino, la administración oral del polifenol redujo la expresión de GFAP e IBA-1 en el núcleo del trigémino, indicando una disminución en la activación de astrocitos y microglía (Yang et al., 2016). Asimismo, en un modelo de lesión espinal, el resveratrol disminuyó los niveles de TNFα e IL1β en la médula, correlacionándose con una reducción de la alodinia mecánica (Han et al., 2023).

Se ha propuesto que las **acciones citoprotectoras del polifenol** están respaldadas por su capacidad para activar vías de señalización que involucran al factor de transcripción Nrf2 y a la enzima SIRT1 (Tamaki et al., 2014), dos reguladores clave de la homeostasis mitocondrial y de los mecanismos de defensa antioxidantes y anti-inflamatorios (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015; Price et al., 2012; Qiang, 2013). Nuestros hallazgos van en línea con esta propuesta. SIRT1 es una desacetilasa dependiente de NAD⁺ capaz de sensar el estado redox y modular procesos celulares esenciales como la reparación del ADN, la biogénesis mitocondrial y la regulación metabólica (Price et al., 2012). Por su parte, Nrf2 regula la expresión de numerosos genes implicados en la defensa antioxidante y la detoxificación, incluyendo enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, NQO-1 y HO-1 (Nguyen et al., 2009; Qiang, 2013). En nuestro estudio, observamos una regulación positiva de SIRT1, Nrf2, NQO-1 y HO-1 en los ganglios dorsales y la médula espinal de animales tratados con oxaliplatino y suplementados con resveratrol. Estos resultados coinciden con estudios previos que demuestran que **la activación de SIRT1 y Nrf2 por resveratrol favorece la respuesta antioxidante y anti-inflamatoria**. En particular, se ha observado que la administración oral de resveratrol aumenta los niveles de ARNm y proteína de SIRT1, así como la expresión de Nrf2, NQO-1 y HO-1 en el tejido gingival de animales con periodontitis (Tamaki et al., 2014). Además, se ha propuesto que el resveratrol actúa como un potente activador de SIRT1, mediante la unión directa al dominio regulador de la enzima (H. Shao et al., 2014). Y al activar SIRT1, puede modular positivamente la vía de Nrf2, potenciando así los efectos protectores frente a estrés oxidativo, neuroinflamación y disfunción mitocondrial (Zhu et al., 2024). En efecto, el papel crítico de la vía de señalización de Nrf2 en la atenuación de la disfunción mitocondrial, la producción de ROS y la apoptosis de las neuronas aferentes primarias inducida por quimioterapia ha sido corroborado mediante el uso de ratones *knock-out* para Nrf2 (Yang et al., 2018). Interesantemente, también se ha demostrado que la SIRT1 espinal media los efectos antinociceptivos del resveratrol en animales sometidos a una constricción crónica del nervio ciático (H. Shao et al., 2014) o con dolor por cáncer óseo (Lux et al., 2019).

Las propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antiapoptóticas del resveratrol han desencadenado efectos neuroprotectores también en modelos experimentales de daño del SNC, evidenciando su capacidad para reducir el deterioro locomotor y prevenir el desarrollo de dolor neuropático (Coyoy-Salgado et al., 2019; Lopez et al., 2015; Pietro et al., 2020; Xu et

al., 2020). En nuestro modelo, las acciones antioxidantes y anti-inflamatorias mediadas por este polifenol probablemente contribuyeron a **reducir el daño en las neuronas aferentes primarias y a atenuar la activación de los circuitos nociceptivos espinales**, resultando en una prevención efectiva de los comportamientos asociados con el dolor neuropático.

En su conjunto, nuestros hallazgos sugieren que el resveratrol, a través de la activación de SIRT1 y Nrf2, podría ofrecer una estrategia efectiva para mitigar la neurotoxicidad y el dolor asociados al uso de oxaliplatino, sugiriendo su utilidad como adyuvante en estrategias destinadas a mitigar los efectos adversos del quimioterápico. El potencial terapéutico del resveratrol en esta condición podría contribuir a reducir la incidencia de NPIQ y mejorar la calidad de vida a largo plazo de los pacientes con cáncer.

5.5 Prevalencia y características clínicas de la neuropatía por oxaliplatino

Nuestros resultados destacan la **elevada prevalencia de neuropatía inducida por oxaliplatino en pacientes con carcinoma colorrectal** en Argentina. Con una prevalencia general del 73%, nuestros hallazgos coinciden con la literatura internacional, que reporta una incidencia media del 60% - 80% entre los pacientes tratados con este derivado del platino (Staff et al., 2019; Uwah et al., 2012b; Velasco & Bruna, 2010; Zedan et al., 2014). Notablemente, entre las variables investigadas como posibles factores de riesgo, se observó una asociación significativa con el sexo femenino. En contraste, la incidencia de NPIO no demostró asociación con la edad, el sobrepeso, el estadio tumoral, el esquema quimioterápico empleado, la dosis de oxaliplatino administrada en cada ciclo, ni la dosis acumulada.

De este modo, uno de los aspectos más relevantes de este trabajo es la clara asociación entre el **sexo** femenino y el riesgo de desarrollar neuropatía periférica, con una mayor prevalencia de síntomas asociados a neurotoxicidad en mujeres. Por otra parte, la severidad del cuadro clínico pareciera ser mayor en los hombres, evidenciado por una mayor persistencia de los síntomas luego de finalizado el tratamiento quimioterápico y una mayor frecuencia de reducción de dosis o interrupción del tratamiento. De hecho, el sexo del paciente es una de las variables que han sido estudiadas como posible factor de riesgo para el desarrollo de neurotoxicidad por oxaliplatino (Ahmed et al., 2019; Alejandro et al., 2013; Uwah et al., 2012b; Velasco & Bruna, 2010). Se ha propuesto que factores hormonales, metabólicos, farmacocinéticos, así como diferencias en la respuesta al estrés, podrían influir en una vulnerabilidad diferencial (Staurengo-Ferrari et al., 2021; Wang et al., 2022).

No obstante, las observaciones de estudios previos no han sido consistentes (Ahmed et al., 2019; Alejandro et al., 2013; Uwah et al., 2012b; Velasco & Bruna, 2010), sugiriendo la elevada complejidad de las interacciones entre los factores involucrados. Nuestros hallazgos concuerdan con reportes previos que también identificaron una mayor prevalencia de NPIO en mujeres, aunque con una mayor frecuencia de cuadros severos en hombres (Velasco & Bruna, 2010). Por su parte, Ahmed y cols. mostraron una prevalencia de neurotoxicidad por oxaliplatino similar en ambos sexos, pero con un mayor riesgo de desarrollar síntomas severos en mujeres (Ahmed et al., 2019). En contraste, otros estudios no encontraron diferencias significativas entre sexos respecto al riesgo de desarrollar neuropatía o a la gravedad de los

síntomas (Alejandro et al., 2013; Uwah et al., 2012; Zribi et al., 2020). La disparidad en los resultados obtenidos subraya la complejidad de la temática, así como la necesidad de realizar nuevos estudios, idealmente prospectivos y multicéntricos, que aborden esta cuestión.

En cuanto a la **edad**, nuestros resultados muestran que la mayoría de los pacientes que desarrolló síntomas compatibles con neuropatía se encontraba en el rango de 45 a 74 años. Este patrón etario es similar al reportado en otras series, donde los pacientes de edad media y avanzada fueron los más afectados, probablemente debido a la presencia de comorbilidades que pueden predisponer a la neurotoxicidad (Mizrahi et al., 2021). No obstante, la ausencia de una asociación significativa en nuestra cohorte sugiere que el impacto de la edad en el desarrollo de neuropatía es menor en comparación con el sexo, como también se ha observado en estudios previos (Griffith et al., 2017; Soveri et al., 2019).

Otro hallazgo interesante de nuestro estudio es la falta de asociación entre el **esquema quimioterápico** y la prevalencia de neurotoxicidad periférica. Los dos esquemas utilizados en nuestros pacientes difieren en la dosis de oxaliplatino administrada en cada ciclo, el intervalo de tiempo entre ciclos, y los fármacos antineoplásicos co-administrados. El esquema FOLFOX implica la administración de dosis menores de oxaliplatino con una mayor frecuencia, en combinación con 5-fluorouracilo (Lieu et al., 2019). En contraste, el esquema XELOX utiliza dosis más altas con mayores intervalos entre dosis, y se combina con capecitabina (Lieu et al., 2019). Dado que, al igual que estudios previos (Griffiths et al., 2018; Soveri et al., 2019), no encontramos diferencias en la prevalencia de neuropatía entre los pacientes tratados con FOLFOX y aquellos tratados con XELOX, podríamos postular que ni la dosis por ciclo, ni la duración del intervalo entre dosis, ni la combinación con otros agentes antineoplásicos son factores determinantes en el desarrollo de neurotoxicidad en nuestra cohorte.

Sin embargo, en el subgrupo de pacientes que desarrolló síntomas compatibles con neuropatía, se observó una asociación significativa entre el sexo femenino y la utilización del esquema **XELOX**, indicando que la mayoría de las mujeres que desarrollaron NPIQ recibieron dicho esquema. Además, el **IMC** de las mujeres con neuropatía fue menor al de los hombres. Estos hallazgos sugieren que la mayor neurotoxicidad observada en mujeres podría deberse a la administración de dosis más altas por ciclo, en combinación con un menor volumen de distribución del fármaco, lo que resultaría en concentraciones plasmáticas más elevadas y, por ende, mayor riesgo de toxicidad. En efecto, una revisión sistemática reciente sostiene que **dosis altas de oxaliplatino por ciclo** se correlacionan con mayor neurotoxicidad (Gebremedhn et al., 2018). Sin embargo, estos hallazgos no han sido siempre consistentes. Mientras que algunos estudios reportan una mayor prevalencia de NPIO en pacientes tratados con el esquema XELOX (130 mg/m²) (Storey et al., 2010), otros muestran una prevalencia similar luego de la administración de FOLFOX (85 mg/m²) (Mizrahi et al., 2021b; Soveri et al., 2019).

La relación entre **dosis acumulada** y riesgo de neurotoxicidad ha sido más consistentemente identificada en diversos estudios (Pietrangeli et al., 2006; Staff et al., 2019; Storey et al., 2010; Wang et al., 2022). Sin embargo, al igual que otros autores (Mizrahi et al., 2021b; Soveri et al., 2019), no encontramos una asociación significativa con dicho parámetro en nuestra cohorte. La ausencia de asociación podría explicarse por el hecho de que el umbral de dosis acumulada reportado en estudios previos oscila entre 1000 y 1800 mg/m², mientras que sólo un bajo porcentaje de nuestros pacientes alcanzó tales dosis. La menor dosis acumulada

detectada en nuestro estudio podría estar relacionada con cambios en la práctica clínica tras la publicación del estudio IDEA en 2018 (Grothey et al., 2018). Dicho estudio demostró que, en pacientes con bajo riesgo de recaída, el uso de 3 meses de tratamiento adyuvante con XELOX no es inferior a 6 meses en términos de supervivencia libre de recaída y mortalidad, y además está asociado con una menor incidencia de neuropatía (Grothey et al., 2018).

Otro hallazgo interesante es la diferencia en el **período de manifestación del cuadro clínico**. Mientras que la mayoría de las mujeres manifestaron síntomas únicamente durante el tratamiento, la mayoría de los hombres lo hicieron tanto durante como después. Aunque no se alcanzó significancia estadística, esta tendencia podría reflejar diferencias en la acumulación de daño neuronal o en la recuperación post-exposición. Como ya se ha mencionado, el daño neurotóxico causado por el oxaliplatino puede persistir o incluso empeorar tras la finalización del tratamiento quimioterápico (Loprinzi et al., 2020; Staff et al., 2017), un fenómeno que parece ser más frecuente en los hombres de nuestra cohorte.

La asociación observada entre el sexo masculino y dosis acumuladas más altas, junto con una mayor persistencia de síntomas y una frecuencia elevada de modificaciones del tratamiento quimioterápico en hombres, sugiere que **la severidad del cuadro clínico** podría ser mayor en pacientes varones, posiblemente como consecuencia de las dosis acumuladas más elevadas.

En conclusión, nuestros resultados muestran la elevada prevalencia de neuropatía inducida por oxaliplatino en una cohorte de pacientes con carcinoma colorrectal de Argentina. Además, refuerzan la importancia del sexo como un factor de riesgo clave en el desarrollo de neurotoxicidad: mientras que las mujeres pueden experimentar una mayor carga de síntomas clínicos, la presentación en hombres puede resultar más severa.

5.6 Contribuciones del trabajo y perspectivas futuras

Este estudio aporta evidencia sólida sobre los cambios moleculares y conductuales inducidos por el oxaliplatino, identifica diferencias significativas según el sexo —tanto en la presentación clínica como en los procesos moleculares involucrados— y demuestra que el resveratrol ejerce efectos neuroprotectores sin comprometer la eficacia antitumoral, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas.

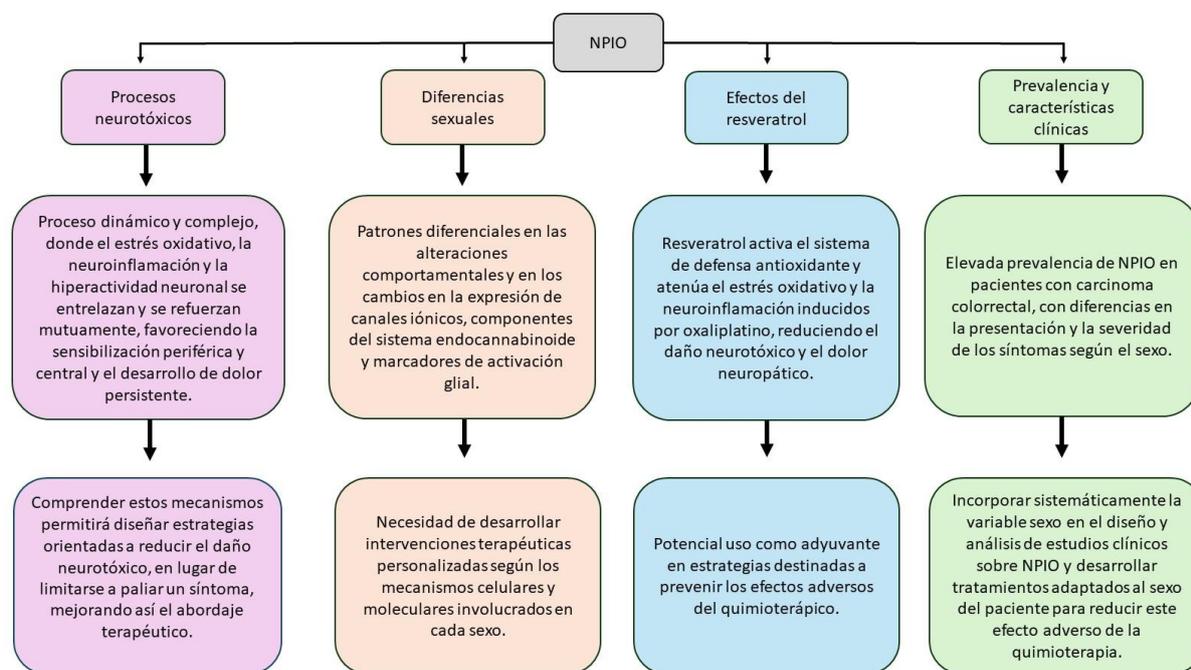


Figura 64. Esquema que resume los principales hallazgos de este trabajo de tesis doctoral.

A partir de estos hallazgos, surgen nuevos interrogantes y se delinear futuras líneas de investigación orientadas a:

- Evaluar los efectos neuroprotectores y antialodínicos del resveratrol en hembras tratadas con oxaliplatino, a fin de confirmar su eficacia en ambos sexos.
- Explorar el papel de las hormonas sexuales en la modulación de los mecanismos neurotóxicos implicados en la neuropatía y el dolor inducidos por quimioterapia, mediante modelos de manipulación hormonal.
- Incorporar modelos de ratones *knock-out* para profundizar en la cascada de eventos implicados en el desarrollo de neuropatía y dolor, y para estudiar en mayor detalle los mecanismos moleculares responsables de los efectos del resveratrol.
- Desarrollar un estudio prospectivo en pacientes oncológicos que permita identificar factores de riesgo (demográficos, clínicos, genéticos y relacionados al tratamiento), evaluar biomarcadores diagnósticos (como los niveles séricos de la cadena liviana de neurofilamento) e implementar instrumentos adecuados para el diagnóstico y seguimiento (escalas y cuestionarios clínico-paciente) (en curso).

En conjunto, estas proyecciones permitirán avanzar hacia una comprensión más profunda y multidimensional de la neuropatía inducida por oxaliplatino, orientando el diseño de estrategias personalizadas que mejoren la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, O. (2019). Effect of Body Mass Index on 5-FU-Based Chemotherapy Toxicity and Efficacy Among Patients With Metastatic Colorectal Cancer; A Pooled Analysis of 5 Randomized Trials. *Clinical Colorectal Cancer*, *18*(4), e385–e393. <https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2019.07.005>
- Abooj, M., Bishnoi, M., Bosgraaf, C. A., & Premkumar, L. S. (2016). Changes in Spinal Cord Following Inflammatory and Neuropathic Pain and the Effectiveness of Resiniferatoxin. *The Open Pain Journal*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.2174/1876386301609010001>
- Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C. O., Cendan, C. M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J. P., Nassar, M. A., Dickenson, A. H., & Wood, J. N. (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5889), 702–705. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1156916>
- Afridi, R., Kim, J. H., Rahman, M. H., & Suk, K. (2020). Metabolic Regulation of Glial Phenotypes: Implications in Neuron–Glia Interactions and Neurological Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 514868. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00020/XML>
- Ahmed, I., Elwakeel, L., Tawfik, A., & Abdel-Malek, R. (2019). Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy Grade in Females with Colorectal Cancer Patients. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*, *3*(1), 116–122. <https://doi.org/10.21608/aps.2019.10411.2020>
- Akassoglou, K., Douni, E., Bauer, J., Lassmann, H., Kollias, G., & Probert, L. (2003). Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(2), 709. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0236046100>
- Alejandro, L., Behrendt, C. E., Chen, K., Openshaw, H., & Shibata, S. (2013). Predicting Acute and Persistent Neuropathy Associated with Oxaliplatin. *Am J Clin Oncol*, *36*(4), 331–337. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e318246b50d>
- Allan, S. M., Tyrrell, P. J., & Rothwell, N. J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews Immunology*, *5*(8), 629–640. <https://doi.org/10.1038/NRI1664>,
- Andreeva, D., Murashova, L., Burzak, N., & Dyachuk, V. (2022). Satellite Glial Cells: Morphology, functional heterogeneity, and role in pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2022.1019449>,
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., & de Gramont, A. (2004). Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *New England Journal of Medicine*, *350*(23), 2343–2351. https://doi.org/10.1056/NEJM0A032709/ASSET/F83DDA7B-CBC7-4522-9C18-61E0D311456B/ASSETS/IMAGES/LARGE/NEJM0A032709_F3.JPG
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., & Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain (London, England)*, *9*(4), 463. <https://doi.org/10.1016/J.EJPAIN.2004.11.001>
- Arango, D., Wilson, A. J., Shi, Q., Corner, G. A., Arañes, M. J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J. M., & Augenlicht, L. H. (2004). Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer*, *91*(11), 1931–1946. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6602215>

- Araujo, J. A., Zhang, M., & Yin, F. (2012). Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. In *Frontiers in Pharmacology: Vol. 3 JUL*. Front Pharmacol. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00119>
- Areti, A., Yerra, V. G., Naidu, V. G. M., & Kumar, A. (2014). Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biology*, 2(1), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.006>
- Argyriou, A. A., Polychronopoulos, P., Koutras, A., Iconomou, G., Gourzis, P., Assimakopoulos, K., Kalofonos, H. P., & Chroni, E. (2006). Is advanced age associated with increased incidence and severity of chemotherapy-induced peripheral neuropathy? *Supportive Care in Cancer : Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 14(3), 223–229. <https://doi.org/10.1007/S00520-005-0868-6>
- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K., & Ting, J. P. Y. (2001). TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1116–1122. <https://doi.org/10.1038/NN738>,
- Artero-Morales, M., González-Rodríguez, S., & Ferrer-Montiel, A. (2018). TRP Channels as Potential Targets for Sex-Related Differences in Migraine Pain. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 73. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00073>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1305>
- Athnaiel, O., Cantillo, S., Paredes, S., & Knezevic, N. N. (2023). The Role of Sex Hormones in Pain-Related Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1866. <https://doi.org/10.3390/IJMS24031866>
- Aubé, B., Lévesque, S. A., Paré, A., Chamma, É., Kébir, H., Gorina, R., Lécuyer, M.-A., Alvarez, J. I., De Koninck, Y., Engelhardt, B., Prat, A., Côté, D., & Lacroix, S. (2014). Neutrophils Mediate Blood–Spinal Cord Barrier Disruption in Demyelinating Neuroinflammatory Diseases. *The Journal of Immunology*, 193(5), 2438–2454. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400401>,
- Authier, N., Gillet, J. P., Fialip, J., Eschalier, A., & Coudore, F. (2000). Description of a short-term Taxol[®]-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Research*, 887(2), 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02910-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02910-3)
- Authier, N., Gillet, J. P., Fialip, J., Eschalier, A., & Coudore, F. (2003). An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Experimental Neurology*, 182(1), 12–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00003-7)
- Aviram, J., Lewitus, G. M., Vysotski, Y., Amna, M. A., Ouryvaev, A., Procaccia, S., Cohen, I., Leibovici, A., Akria, L., Goncharov, D., Mativ, N., Kauffman, A., Shai, A., Bar-Sela, G., & Meiri, D. (2022). The Effectiveness and Safety of Medical Cannabis for Treating Cancer Related Symptoms in Oncology Patients. *Frontiers in Pain Research*, 3, 861037. <https://doi.org/10.3389/FPAIN.2022.861037>
- Avona, A., Burgos-Ega, C., Burton, M. D., Akopian, A. N., Price, T. J., & Dussor, G. (2019). Dural Calcitonin Gene-Related Peptide Produces Female-Specific Responses in Rodent Migraine Models. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 39(22), 4323–4331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0364-19.2019>

- Bajaj, P., Arendt-Nielsen, L., Bajaj, P., & Madsen, H. (2001). Sensory changes during the ovulatory phase of the menstrual cycle in healthy women. *European Journal of Pain (London, England)*, 5(2), 135–144. <https://doi.org/10.1053/EUJP.2001.0236>
- Bakogeorgos, M., & Georgoulas, V. (2017a). Risk-reduction and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(11), 1045–1060. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1374856>
- Bakogeorgos, M., & Georgoulas, V. (2017b). Risk-reduction and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17,11, 1045–1060. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1374856>
- Barcelon, E., Chung, S., Lee, J., & Lee, S. J. (2023). Sexual Dimorphism in the Mechanism of Pain Central Sensitization. *Cells*, 12(16), 2028. <https://doi.org/10.3390/CELLS12162028>
- Bartley, E. J., & Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 111(1), 52. <https://doi.org/10.1093/BJA/AET127>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.09.028>
- Basso, L., & Altier, C. (2017). Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 32, 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2016.10.002>
- Becker, G., Fialho, M. F. P., Brusco, I., & Oliveira, S. M. (2023). Kinin B1 and B2 Receptors Contribute to Cisplatin-Induced Painful Peripheral Neuropathy in Male Mice. *Pharmaceutics*, 15(3), 852. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15030852/S1>
- Belzer, V., & Hanani, M. (2019). Nitric oxide as a messenger between neurons and satellite glial cells in dorsal root ganglia. *Glia*, 67(7), 1296–1307. <https://doi.org/10.1002/GLIA.23603>
- Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precision Oncology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/S41698-017-0038-6>
- Bernaus, A., Blanco, S., & Sevilla, A. (2020). Glia Crosstalk in Neuroinflammatory Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 539179. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00209/XML>
- Bhatt, S. R., Lokhandwala, M. F., & Banday, A. A. (2011). Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 667(1–3), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.026>
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R. R., Bean, B. P., Woolf, C. J., & Samad, T. A. (2008). Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(52), 14062–14073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. In *World Allergy Organization Journal* (Vol. 5, Issue 1, pp. 9–19). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

- Birnie, K. A., Hundert, A. S., Lalloo, C., Nguyen, C., & Stinson, J. N. (2019). Recommendations for selection of self-report pain intensity measures in children and adolescents: A systematic review and quality assessment of measurement properties. *Pain, 160*(1), 5–18. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001377>
- Blanton, H. L., Barnes, R. C., McHann, M. C., Bilbrey, J. A., Wilkerson, J. L., & Guindon, J. (2021). Sex differences and the endocannabinoid system in pain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 202*, 173107. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2021.173107>
- Blanton, H. L., Brelsfoard, J., DeTurk, N., Pruitt, K., Narasimhan, M., Morgan, D. J., & Guindon, J. (2019). Cannabinoids: Current and Future Options to Treat Chronic and Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Drugs, 79*(9), 969–995. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01132-x>
- Boddeke, E. W. G. M. (2001). Involvement of chemokines in pain. *European Journal of Pharmacology, 429*(1–3), 115–119. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01311-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01311-5)
- Boehmerle, W., Huehnchen, P., Peruzzaro, S., Balkaya, M., & Endres, M. (2014). Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Scientific Reports, 4*. <https://doi.org/10.1038/SREP06370>
- Boerner, K. E., Chambers, C. T., Gahagan, J., Keogh, E., Fillingim, R. B., & Mogil, J. S. (2018). Conceptual complexity of gender and its relevance to pain. *Pain, 159*(11), 2137–2141. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001275>
- Bouillon, L., Finn, D. P., & Llorente-Berzal, Á. (2021). Sex Differences in a Rat Model of Peripheral Neuropathic Pain and Associated Levels of Endogenous Cannabinoid Ligands. *Frontiers in Pain Research, 0*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPAIN.2021.673638>
- Branca, J. J. V., Carrino, D., Gulisano, M., Ghelardini, C., Di Cesare Mannelli, L., & Pacini, A. (2021). Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Genetic and Epigenetic Profile to Better Understand How to Ameliorate This Side Effect. *Frontiers in Molecular Biosciences, 8*, 643824. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.643824/BIBTEX>
- Buckwalter, M. S., & Wyss-Coray, T. (2004). Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo. *Journal of Neuroinflammation, 1*(1). <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-10>,
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(11), 3337–3340. <https://doi.org/10.1021/jf0112973>
- Cairns, B. E., Arendt-Nielsen, L., & Sacerdote, P. (2015). Perspectives in Pain Research 2014: Neuroinflammation and glial cell activation: The cause of transition from acute to chronic pain? *Scandinavian Journal of Pain, 6*(C), 3–6. <https://doi.org/10.1016/J.SJPAIN.2014.10.002>
- Calls, A., Carozzi, V., Navarro, X., Monza, L., & Bruna, J. (2020). Pathogenesis of platinum-induced peripheral neurotoxicity: Insights from preclinical studies. *Experimental Neurology, 325*, 113141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113141>
- Calls, A., Torres-Espin, A., Tormo, M., Martínez-Escardó, L., Bonet, N., Casals, F., Navarro, X., Yuste, V. J., Udina, E., & Bruna, J. (2022). A transient inflammatory response contributes to oxaliplatin neurotoxicity in mice. *Annals of Clinical and Translational Neurology, 9*(12), 1985–1998. <https://doi.org/10.1002/ACN3.51691>

- Casadei, M., Fiore, E., Rubione, J., Domínguez, L. M., Coronel, M. F., Leiguarda, C., García, M., Mazzolini, G., Villar, M. J., Montaner, A., Constandil, L., Romero-Sandoval, E. A., & Brumovsky, P. R. (2022). IMT504 blocks allodynia in rats with spared nerve injury by promoting the migration of mesenchymal stem cells and by favoring an anti-inflammatory milieu at the injured nerve. *Pain*, *163*(6), 1114–1129. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002476>
- Casale, R., Atzeni, F., Bazzichi, L., Beretta, G., Costantini, E., Sacerdote, P., & Tassorelli, C. (2021). Pain in Women: A Perspective Review on a Relevant Clinical Issue that Deserves Prioritization. *Pain and Therapy*, *10*(1), 287–314. <https://doi.org/10.1007/s40122-021-00244-1>
- Cassidy, J., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Rittweger, K., Gilberg, F., & Saltz, L. (2011). XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *British Journal of Cancer*, *105*(1), 58. <https://doi.org/10.1038/BJC.2011.201>
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Minno, G. Di, & Ritieni, A. (2019). Red wine consumption and cardiovascular health. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24193626>
- Cavaletti, G., Marmiroli, P., Renn, C. L., Dorsey, S. G., Serra, M. P., Quartu, M., & Meregalli, C. (2021). Cannabinoids: an Effective Treatment for Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity? *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *18*(4), 2324–2336. <https://doi.org/10.1007/S13311-021-01127-1>
- Chakraborty, R., & Goswami, C. (2022). Both heat-sensitive TRPV4 and cold-sensitive TRPM8 ion channels regulate microglial activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *611*, 132–139. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.04.032>
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/NRN1078>,
- Chaplan, S. R., Bach, F., Pogrel, J., Chung, J., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, *1*, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)
- Chen, N. F., Huang, S. Y., Chen, W. F., Chen, C. H., Lu, C. H., Chen, C. L., Yang, S. N., Wang, H. M., & Wen, Z. H. (2013). TGF- β 1 attenuates spinal neuroinflammation and the excitatory amino acid system in rats with neuropathic pain. *Journal of Pain*, *14*(12), 1671–1685. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.08.010>
- Chen, W. J. (2023). TGF- β Regulation of T Cells. *Annual Review of Immunology*, *41*(Volume 41, 2023), 483–512. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-101921-045939/1>
- Chen, Y., Navratilova, E., Dodick, D., & Porreca, F. (2020). An Emerging Role for Prolactin in Female-Selective Pain. *Trends in Neurosciences*, *43*(8), 635–648. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.06.003/ASSET/1A654843-041A-4FA3-973A-366198087C14/MAIN.ASSETS/GR1.SML>
- Chine, V. B., Au, N. P. B., Kumar, G., & Ma, C. H. E. (2019). Targeting Axon Integrity to Prevent Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Molecular Neurobiology*, *56*(5), 3244–3259. <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1301-8>

- Chine, V. B., Au, N. P. B., & Ma, C. H. E. (2019). Therapeutic benefits of maintaining mitochondrial integrity and calcium homeostasis by forced expression of Hsp27 in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neurobiology of Disease*, *130*.
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.104492>
- Choi, Y., Yoon, Y. W., Na, H. S., Kim, S. H., & Chung, J. M. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *PAIN*, *59*(3).
- Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I., Chao, M. V., & Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature*, *411*(6840), 957–962.
<https://doi.org/10.1038/35082088>,
- Chukyo, A., Chiba, T., Kambe, T., Yamamoto, K., Kawakami, K., Taguchi, K., & Abe, K. (2018). Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. *Neuropeptides*, *67*, 95–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.12.002>
- Çiftçi, U., Delen, E., Vural, M., Uysal, O., Coşan, D. T., Baydemir, C., & Doğaner, F. (2016). Efficacy of resveratrol and quercetin after experimental spinal cord injury. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, *22*(5), 423–431. <https://doi.org/10.5505/tjtes.2016.44575>
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. In *Redox Biology* (Vol. 15, pp. 490–503). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Cocetta, V., Quagliariello, V., Fiorica, F., Berretta, M., & Montopoli, M. (2021). Resveratrol as chemosensitizer agent: State of art and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS22042049>
- Colburn, R. W., Lubin, M. Lou, Stone, D. J., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R. R., Brandt, M. R., Liu, Y., Flores, C. M., & Qin, N. (2007). Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice. *Neuron*, *54*(3), 379–386. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.04.017>
- Colvin, L. A. (2019). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: where are we now? *Pain*, *160 Suppl 1*(Suppl 1), S1–S10. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001540>
- Comeau, T. B., Epstein, J. B., & Migas, C. (2001). Taste and smell dysfunction in patients receiving chemotherapy: A review of current knowledge. *Supportive Care in Cancer*, *9*(8), 575–580.
<https://doi.org/10.1007/S005200100279>,
- Cooper, Z. D., & Craft, R. M. (2018). Sex-Dependent Effects of Cannabis and Cannabinoids: A Translational Perspective. *Neuropsychopharmacology*, *43*(1), 34–51.
<https://doi.org/10.1038/npp.2017.140>
- Coraggio, V., Guida, F., Boccella, S., Scafuro, M., Paino, S., Romano, D., Maione, S., & Luongo, L. (2018). Neuroimmune-Driven Neuropathic Pain Establishment: A Focus on Gender Differences. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 281, *19*(1), 281.
<https://doi.org/10.3390/IJMS19010281>
- Coronel, M. F., Brumovsky, P. R., Hökfelt, T., & Villar, M. J. (2008). Differential galanin upregulation in dorsal root ganglia and spinal cord after graded single ligature nerve constriction of the rat

- sciatic nerve. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(1), 94–100.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.07.001>
- Coronel, M. F., Labombarda, F., De Nicola, A. F., & Gonzalez, S. L. (2014). Progesterone reduces the expression of spinal cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase and prevents allodynia in a rat model of central neuropathic pain. *Eur J Pain*, 18(3), 348–359.
- Coronel, M. F., Labombarda, F., Villar, M. J., De Nicola, A. F., & González, S. L. (2011). Progesterone prevents allodynia after experimental spinal cord injury. *J Pain*, 12(1), 71–83.
- Coronel, M. F., Raggio, M. C., Adler, N. S., De Nicola, A. F., Labombarda, F., & González, S. L. (2016). Progesterone modulates pro-inflammatory cytokine expression profile after spinal cord injury: Implications for neuropathic pain. *Journal of Neuroimmunology*, 292, 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.011>
- Coronel, M. F., Raggio, M. C., Adler, N. S., De Nicola, A. F., Labombarda, F., & Gonzalez, S. L. (2016). Progesterone modulates pro-inflammatory cytokine expression profile after spinal cord injury: implications for neuropathic pain. *J Neuroimmunol*, 292, 85–92.
- Coronel, M. F., Villar, M. J., Brumovsky, P. R., & Gonzalez, S. L. (2017). Spinal neuropeptide expression and neuropathic behavior in the acute and chronic phases after spinal cord injury: effects of progesterone administration. *Peptides*, 88, 189–195.
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330(6000), 55–60.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1193270/SUPPL_FILE/COSTE-SOM.PDF
- Coyoy-Salgado, A., Segura-Urbe, J. J., Guerra-Araiza, C., Orozco-Suárez, S., Salgado-Ceballos, H., Feria-Romero, I. A., Gallardo, J. M., & Orozco-Barrios, C. E. (2019). *The Importance of Natural Antioxidants in the Treatment of Spinal Cord Injury in Animal Models: An Overview*.
<https://doi.org/10.1155/2019/3642491>
- Craft, R. M. (2007). Modulation of pain by estrogens. *Pain*, 132 Suppl 1(SUPPL. 1), S3.
<https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2007.09.028>
- Craft, R. M., Kandasamy, R., & Davis, S. M. (2013). Sex differences in anti-allodynic, anti-hyperalgesic and anti-edema effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the rat. *Pain*, 154(9), 1709–1717.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.05.017>
- Cui, J., Sun, R., Yu, Y., Gou, S., Zhao, G., & Wang, C. (2010). Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytother Res*, 24(11), 1637–1644.
- Czerniczyniec, A., Lanza, E. M., Karadayian, A. G., Bustamante, J., & Lores-Arnaiz, S. (2015). Impairment of striatal mitochondrial function by acute paraquat poisoning. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(5), 395–408. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9624-x>
- Dai, Y. (2016). TRPs and pain. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 38, Issue 3, pp. 277–291).
<https://doi.org/10.1007/s00281-015-0526-0>
- D'AMOUR, F. E., & SMITH, D. L. (1941). A METHOD FOR DETERMINING LOSS OF PAIN SENSATION. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 72(1), 74–79.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3565\(25\)03823-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3565(25)03823-6)

- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, *8*(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/NN1472>,
- De Logu, F., Nassini, R., Materazzi, S., Carvalho Gonçalves, M., Nosi, D., Rossi Degl'Innocenti, D., Marone, I. M., Ferreira, J., Li Puma, S., Benemei, S., Trevisan, G., Souza Monteiro De Araújo, D., Patacchini, R., Bunnett, N. W., & Geppetti, P. (2017). Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-01739-2>
- De Logu, F., Puma, S. L., Landini, L., Portelli, F., Innocenti, A., De Araujo, D. S. M., Janal, M. N., Patacchini, R., Bunnett, N. W., Geppetti, P., & Nassini, R. (2019). Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(12), 5424–5441. <https://doi.org/10.1172/JCI128022>
- Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, *10*(9), 369–377. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01803-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01803-1)
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., Lazdunski, M., Eschalier, A., Authier, N., & Bourinet, E. (2011a). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Molecular Medicine*, *3*(5), 266–278. https://doi.org/10.1002/EMMM.201100134/SUPPL_FILE/EMMM_201100134_SM_SUPPDATA.PDF
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., Lazdunski, M., Eschalier, A., Authier, N., & Bourinet, E. (2011b). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Molecular Medicine*, *3*(5), 266. <https://doi.org/10.1002/EMMM.201100134>
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017a). Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*, 271711. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00284/PDF>
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017b). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00284>
- Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., & Waxman, S. G. (2008). Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. *Advances in Genetics*, *63*, 85–110. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)01004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)01004-3)
- Di Marino, C., Llorente-Berzal, Á., Diego, A. M., Bella, A., Boullon, L., Berrocoso, E., Roche, M., & Finn, D. P. (2024). Characterisation of the effects of the chemotherapeutic agent paclitaxel on neuropathic pain-related behaviour, anxiodepressive behaviour, cognition, and the endocannabinoid system in male and female rats. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1505980. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1505980/BIBTEX>
- Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 88, Issue Part B, pp. 179–188). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036>

- Dixon, W. (1980). Efficient analysis of experimental observation. *Pharmacologia, Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20, 441–462.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>
- Donegan, M., Kernisant, M., Cua, C., Jasmin, L., & Ohara, P. T. (2013). Satellite glial cell proliferation in the trigeminal ganglia after chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *GLIA*, 61(12), 2000–2008. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22571>,
- Dong, X. D., Mann, M. K., Kumar, U., Svensson, P., Arendt-Nielsen, L., Hu, J. W., Sessle, B. J., & Cairns, B. E. (2007). SEX-RELATED DIFFERENCES IN NMDA-EVOKED RAT MASSETER MUSCLE AFFERENT DISCHARGE RESULT FROM ESTROGEN-MEDIATED MODULATION OF PERIPHERAL NMDA RECEPTOR ACTIVITY. *Neuroscience*, 146(2), 822.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2007.01.051>
- Doyle, T. M., & Salvemini, D. (2021). Mini-Review: Mitochondrial dysfunction and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 760.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2021.136087>,
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Echeverry, S., Shi, X. Q., Haw, A., Liu, H., Zhang, Z. W., & Zhang, J. (2009). Transforming growth factor- β 1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Molecular Pain*, 5, 16.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-16>
- Egashira, N. (2021). Pathological Mechanisms and Preventive Strategies of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Pain Research*, 2, 804260.
<https://doi.org/10.3389/FPAIN.2021.804260/BIBTEX>
- Enciso-Pablo, O., Méndez-Reséndiz, K., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. (2021). *Nociceptive TRP Channels and Sex Steroids*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95552>
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>
- Feldman, P., Due, M. R., Ripsch, M. S., Khanna, R., & White, F. A. (2012). The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-180>
- Feng, Y., Cui, Y., Gao, J. L., Li, R., Jiang, X. H., Tian, Y. X., Wang, K. J., Li, M. H., Zhang, H. A., & Cui, J. Z. (2016). Traumatic brain injury in rats: Involvement of synaptic proteins and neuronal autophagy. *Molecular Medicine Reports*, 13(6), 5248–5254.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5201>
- Ferrari, L. F., Araldi, D., Green, P. G., & Levine, J. D. (2020). Marked sexual dimorphism in neuroendocrine mechanisms for the exacerbation of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy by stress. *Pain*, 161(4), 865–874.
<https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001798>

- Filligim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., & Riley, J. L. (2009a). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *The Journal of Pain*, *10*(5), 447–485. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2008.12.001>
- Filligim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., & Riley, J. L. (2009b). Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *Journal of Pain*, *10*(5), 447–485. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.12.001>
- Finn, D. P., Haroutounian, S., Hohmann, A. G., Krane, E., Soliman, N., & Rice, A. S. C. (2021). Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. In *Pain* (Vol. 162). <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002268>
- Finnerup, N. B. (2017). Neuropathic pain and spasticity: Intricate consequences of spinal cord injury. In *Spinal Cord* (Vol. 55, Issue 12, pp. 1046–1050). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sc.2017.70>
- Finnerup, N. B., Kuner, R., & Jensen, T. S. (2021). Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiological Reviews*, *101*(1), 259–301. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00045.2019>
- Fischer, R., Maier, O., Siegemund, M., Wajant, H., Scheurich, P., & Pfizenmaier, K. (2011). A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS ONE*, *6*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0027621>,
- Flatters, S. J. L., Dougherty, P. M., & Colvin, L. A. (2017). Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): A narrative review. *British Journal of Anaesthesia*, *119*(4), 737–749. <https://doi.org/10.1093/bja/aex229>
- Friction, J. (2015). The Need for Preventing Chronic Pain: The “Big Elephant in the Room” Of Healthcare. *Global Advances in Health and Medicine*, *4*(1), 6. <https://doi.org/10.7453/GAHMJ.2014.075>
- Fu, C. M., Yin, Z. S., Yu, D. F., & Yang, Z. H. (2013). Substance P and calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglia in sciatic nerve injury rats. *Neural Regeneration Research*, *8*(33), 3124. <https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1673-5374.2013.33.006>
- Fujita, S., Hirota, T., Sakiyama, R., Baba, M., & Ieiri, I. (2019). Identification of drug transporters contributing to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Journal of Neurochemistry*, *148*(3), 373–385. <https://doi.org/10.1111/JNC.14607>
- Fumagalli, G., Monza, L., Cavaletti, G., Rigolio, R., & Meregalli, C. (2021). Neuroinflammatory Process Involved in Different Preclinical Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.626687>
- Fu, S., Lv, R., Wang, L., Hou, H., Liu, H., & Shao, S. (2018). Resveratrol, an antioxidant, protects spinal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*(2), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.019>
- Gao, X., Kim, H. K., Chung, J. M., & Chung, K. (2007). Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain*, *131*(3), 262–271. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2007.01.011>

- Gao, Y.-J., & Ji, R.-R. (2021). c-Fos or pERK, Which is a Better Marker for Neuronal Activation and Central Sensitization After Noxious Stimulation and Tissue Injury? *AACE Clinical Case Reports*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.2174/1876386300902010011>
- García-Domínguez, M. (2025). NGF in Neuropathic Pain: Understanding Its Role and Therapeutic Opportunities. *Current Issues in Molecular Biology 2025*, Vol. 47, Page 93, 47(2), 93. <https://doi.org/10.3390/CIMB47020093>
- García-Larrea, L., & Peyron, R. (2013). Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. *Pain*, 154 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.09.001>
- García-Ovejero, D., Arevalo-Martin, A., Petrosino, S., Docagne, F., Hagen, C., Bisogno, T., Watanabe, M., Guaza, C., Di Marzo, V., & Molina-Holgado, E. (2009). The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiology of Disease*, 33(1), 57–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.09.015>
- Gebremedhn, E. G., Shortland, P. J., & Mahns, D. A. (2018). The incidence of acute oxaliplatin-induced neuropathy and its impact on treatment in the first cycle: A systematic review. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4185-0>
- Ghazisaeidi, S., Muley, M. M., & Salter, M. W. (2023). Neuropathic Pain: Mechanisms, Sex Differences, and Potential Therapies for a Global Problem. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 63(Volume 63, 2023), 565–583. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-051421-112259/1>
- Giordano, J., Abramson, K., & Boswell, M. (2010). *Pain assessment: subjectivity, objectivity, and the use of neurotechnology*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20648198/>
- Gkika, D., Lolignier, S., Grolez, G. P., Bavencoffe, A., Shapovalov, G., Gordienko, D., Kondratskyi, A., Meleine, M., Prival, L., Chapuy, E., Etienne, M., Eschalier, A., Shuba, Y., Skryma, R., Busserolles, J., & Prevarskaya, N. (2020). Testosterone-androgen receptor: The steroid link inhibiting TRPM8-mediated cold sensitivity. *FASEB Journal*, 34(6), 7483–7499. <https://doi.org/10.1096/FJ.201902270R;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION>
- Gold, M. S., & Gebhart, G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, 16(11), 1248. <https://doi.org/10.1038/NM.2235>
- Gomez-Barrios, J., & Tortorici, V. (2009). *Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica*. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-02642009000100002&script=sci_arttext&utm_source=chatgpt.com
- Gonçalves, N. P., Vægter, C. B., Andersen, H., Østergaard, L., Calcutt, N. A., & Jensen, T. S. (2017). Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. *Nature Reviews. Neurology*, 13(3), 135–147. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2016.201>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. In *Neuromethods* (Vol. 42, pp. 1–20). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- Gregory, N. S., Harris, A. L., Robinson, C. R., Dougherty, P. M., Fuchs, P. N., & Sluka, K. A. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 14(11), 10.1016/j.jpain.2013.06.008. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2013.06.008>

- Gregus, A. M., Levine, I. S., Eddinger, K. A., Yaksh, T. L., & Buczynski, M. W. (2021). Sex differences in neuroimmune and glial mechanisms of pain. *Pain*, *162*(8), 2186. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002215>
- Griffith, K. A., Zhu, S., Johantgen, M., Kessler, M. D., Renn, C., Beutler, A. S., Kanwar, R., Ambulos, N., Cavaletti, G., Bruna, J., Briani, C., Argyriou, A. A., Kalofonos, H. P., Yerges-Armstrong, L. M., & Dorsey, S. G. (2017). Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy and Identification of Unique Severity Groups in Colorectal Cancer. *Journal of Pain and Symptom Management*, *54*(5), 701-706.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2017.07.033>
- Griffiths, L. A., Duggett, N. A., Pitcher, A. L., & Flatters, S. J. L. (2018). Evoked and Ongoing Pain-Like Behaviours in a Rat Model of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Pain Research & Management*, *2018*, 8217613. <https://doi.org/10.1155/2018/8217613>
- Grolleau, F., Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Lapied, B., Pelhate, M., & Gamelin, E. (2001). A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *Journal of Neurophysiology*, *85*(5), 2293–2297. <https://doi.org/10.1152/JN.2001.85.5.2293/ASSET/IMAGES/LARGE/9K0511660003.JPEG>
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, *13*(15), 1899–1911. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.15.1899>
- Grothey, A., Sobrero, A. F., Shields, A. F., Yoshino, T., Paul, J., Taieb, J., Souglakos, J., Shi, Q., Kerr, R., Labianca, R., Meyerhardt, J. A., Vernerey, D., Yamanaka, T., Boukovinas, I., Meyers, J. P., Renfro, L. A., Niedzwiecki, D., Watanabe, T., Torri, V., ... Iveson, T. (2018). Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *378*(13), 1177–1188. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1713709>
- Guan, Z., Kuhn, J. A., Wang, X., Colquitt, B., Solorzano, C., Vaman, S., Guan, A. K., Evans-Reinsch, Z., Braz, J., Devor, M., Abboud-Werner, S. L., Lanier, L. L., Lomvardas, S., & Basbaum, A. I. (2016). Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 94–101. <https://doi.org/10.1038/NN.4189>
- Guindon, J., & Hohmann, A. G. (2009). The endocannabinoid system and pain. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *8*(6), 403–421. <https://doi.org/10.2174/187152709789824660>
- Guindon, J., Lai, Y., Takacs, S. M., Bradshaw, H. B., & Hohmann, A. G. (2013). Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy-induced peripheral neuropathy: effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following c. *Pharmacological Research*, *67*(1), 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.013>
- Gulyás, M., Bencsik, N., Pusztai, S., Liliom, H., & Schlett, K. (2016). AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program. *Neuroinformatics*, *14*(4), 479–481. <https://doi.org/10.1007/S12021-016-9303-Z>
- Guo, T. Z., Shi, X., Li, W. W., Wei, T., Clark, J. D., & Kingery, W. S. (2019). Sex differences in the temporal development of pronociceptive immune responses in the tibia fracture mouse model. *Pain*, *160*(9), 2013–2027. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001592>

- Guo, W., Wang, H., Watanabe, M., Shimizu, K., Zou, S., LaGraize, S. C., Wei, F., Dubner, R., & Ren, K. (2007). Glial–Cytokine–Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain. *The Journal of Neuroscience*, *27*(22), 6006. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0176-07.2007>
- Guo, Y., Xiong, B. H., Zhang, T., Cheng, Y., & Ma, L. (2016). XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis. *Cancer Investigation*, *34*(2), 94–104. <https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1104689>,
- Hameed, S. (2019). Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Molecular Pain*, *15*, 1744806919858801. <https://doi.org/10.1177/1744806919858801>
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *48*(3), 457–476. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2004.09.001>
- Han, J., Hua, Z., Yang, W. J., Wang, S., Yan, F., Wang, J. N., & Sun, T. (2023). Resveratrol suppresses neuroinflammation to alleviate mechanical allodynia by inhibiting Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway in a rat model of spinal cord injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1116679. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2023.1116679>
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, *32*(1), 77–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)
- Harte, S. E., Meyers, J. B., Donahue, R. R., Taylor, B. K., & Morrow, T. J. (2016). Mechanical Conflict System: A Novel Operant Method for the Assessment of Nociceptive Behavior. *PLOS ONE*, *11*(2), e0150164. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150164>
- Hartlehnert, M., Derksen, A., Hagenacker, T., Kindermann, D., Schäfers, M., Pawlak, M., Kieseier, B. C., & Meyer Zu Horste, G. (2017). Schwann cells promote post-traumatic nerve inflammation and neuropathic pain through MHC class II. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12744-2>
- Hawker, G. A., Mian, S., Kendzerska, T., & French, M. (2011). Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care & Research*, *63*(S11), S240–S252. <https://doi.org/10.1002/ACR.20543>
- Hayward, R., Moore, S., Artun, D., Madhavan, A., Harte, E., Torres-Pérez, J. V., & Nagy, I. (2024). Transcriptional reprogramming post-peripheral nerve injury: A systematic review. *Neurobiology of Disease*, *200*, 106624. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2024.106624>
- He, Q. R., Cong, M., Yu, F. H., Ji, Y. H., Yu, S., Shi, H. Y., & Ding, F. (2022). Peripheral nerve fibroblasts secrete neurotrophic factors to promote axon growth of motoneurons. *Neural Regeneration Research*, *17*(8), 1833–1840. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332159>,
- Hiura, A., & Nakagawa, H. (2012). Roles of Glia, Immune Cells and the Thermo-TRP Channels, TRPV1, TRPA1 and TRPM8, in Pathological Pain. *The Open Neuroscience Journal*, *6*, 10–26.

- Höke, A., & Ray, M. (2014). Rodent Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *ILAR Journal*, 54(3), 273–281. <https://doi.org/10.1093/ILAR/ILT053>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Hong, H., Kim, B. S., & Im, H. I. (2016). Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *International Neuropsychology Journal*, 20(Suppl 1), S2–S7. <https://doi.org/10.5213/INJ.1632604.302>,
- Hossain, M. Z., Unno, S., Ando, H., Masuda, Y., & Kitagawa, J. (2017). Neuron–Glia Crosstalk and Neuropathic Pain: Involvement in the Modulation of Motor Activity in the Orofacial Region. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 2051, 18(10), 2051. <https://doi.org/10.3390/IJMS18102051>
- Hwang, B.-Y., Kim, E.-S., Kim, C.-H., Kwon, J.-Y., & Kim, H.-K. (2012). Gender differences in paclitaxel-induced neuropathic pain behavior and analgesic response in rats. *Korean J Anesthesiol*, 62(1), 66–72. <https://doi.org/10.4097/kjae.2012.62.1.66>
- Illias, A. M., Yu, K. J., Hwang, S. H., Solis, J., Zhang, H., Velasquez, J. F., Cata, J. P., & Dougherty, P. M. (2022). Dorsal root ganglion toll-like receptor 4 signaling contributes to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Pain*, 163(5), 923–935. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002454>,
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
- Jeffrey, W., & Huang, Y. (2007). Pharmacogenomics of sex difference in chemotherapeutic toxicity. *Current Drug Discovery Technologies*, 4(1), 59–68. <https://doi.org/10.2174/157016307781115485>
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. C., & Treede, R. D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *PAIN®*, 152(10), 2204–2205. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2011.06.017>
- Jensen, T. S., & Finnerup, N. B. (2014). Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*, 13(9), 924–935. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4)
- Jesus Palma, A. C. de, Antunes Júnior, C. R., Barreto, E. S. R., Alencar, V. B., Souza, A. K. do N., Mathias, C. M. de C., Lins-Kusterer, L. E. F., Azi, L. M. T. de A., & Kraychete, D. C. (2025). Pharmacological Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathy: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Pain Management Nursing*. <https://doi.org/10.1016/J.PMN.2025.01.007>
- Jia, Z., Zhu, H., Li, J., Wang, X., Misra, H., & Li, Y. (2012). Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. In *Spinal Cord* (Vol. 50, Issue 4, pp. 264–274). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sc.2011.111>

- Jin, S. X., Zhuang, Z. Y., Woolf, C. J., & Ji, R. R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(10), 4017–4022. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04017.2003>
- Ji, R. R., Berta, T., & Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *PAIN®*, *154*(SUPPL. 1), S10–S28. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.06.022>
- Ji, R. R., Chamesian, A., & Zhang, Y. Q. (2016a). Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, *354*(6312), 572–577. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF8924>
- Ji, R. R., Chamesian, A., & Zhang, Y. Q. (2016b). Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, *354*(6312), 572–577. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF8924>
- Ji, R. R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., & Maixner, W. (2018). Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology*, *129*(2), 343. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>
- Ji, R. R., Samad, T. A., Jin, S. X., Schmoll, R., & Woolf, C. J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, *36*(1), 57–68. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00908-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00908-X)
- Joseph, E. K., & Levine, J. D. (2009). Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *The Journal of Pain*, *10*(5), 534–541. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2008.12.003>
- Kagiava, A., Tsingotjidou, A., Emmanouilides, C., & Theophilidis, G. (2008). The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat. *NeuroToxicology*, *29*(6), 1100–1106. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2008.09.005>
- Kalemci, S., Tanrıverdi, O., Şimşek, A., Aksun, S., Celik, O. I., Barutca, S., Zeybek, A., & Demirci, B. (2019a). Evaluation of oxaliplatin-induced pulmonary toxicity in rats. *Contemporary Oncology*, *23*(3), 151. <https://doi.org/10.5114/WO.2019.89242>
- Kalemci, S., Tanrıverdi, O., Şimşek, A., Aksun, S., Celik, O. I., Barutca, S., Zeybek, A., & Demirci, B. (2019b). Evaluation of oxaliplatin-induced pulmonary toxicity in rats. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, *23*(3), 151–156. <https://doi.org/10.5114/WO.2019.89242>
- Kang, L., Tian, Y., Xu, S., & Chen, H. (2021). Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. *Journal of Neurology*, *268*(9), 3269–3282. <https://doi.org/10.1007/S00415-020-09942-W>
- Kannan, K., & Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. In *Pathophysiology* (Vol. 7, Issue 3, pp. 153–163). Pathophysiology. [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(00\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00053-5)
- Kano, M., Farmer, A. D., Aziz, Q., Giampietro, V. P., Brammer, M. J., Williams, S. C. R., Fukudo, S., & Coen, S. J. (2013). Sex differences in brain response to anticipated and experienced visceral pain in healthy subjects. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*,

304(8), 687–699.

<https://doi.org/10.1152/AJPGI.00385.2012/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30071364280004.JPEG>

- Kato, Y., Shigehara, K., Kawaguchi, S., Izumi, K., Kadono, Y., & Mizokami, A. (2020). Efficacy of testosterone replacement therapy on pain in hypogonadal men with chronic pain syndrome: A subanalysis of a prospective randomised controlled study in Japan (EARTH study). *Andrologia*, 52(9). <https://doi.org/10.1111/AND.13768>
- Kavanagh, S., Bril, V., & Lipton, J. H. (2018). Peripheral neuropathy associated with imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood Research*, 53(2), 172. <https://doi.org/10.5045/BR.2018.53.2.172>
- Kawasaki, M., Ponzio, T. A., Yue, C., Fields, R. L., & Gainer, H. (2009). Neurotransmitter regulation of c-fos and vasopressin gene expression in the rat supraoptic nucleus. *Experimental Neurology*, 219(1), 212–222. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2009.05.019>
- Keogh, E. (2022). Sex and gender differences in pain: past, present, and future. *Pain*, 163(Suppl 1), S108–S116. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002738>
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00011.2010>
- Khasabova, I. A., Yao, X., Paz, J., Lewandowski, C. T., Lindberg, A. E., Coicou, L., Burlakova, N., Simone, D. A., & Seybold, V. S. (2014). JZL184 is anti-hyperalgesic in a murine model of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 0, 67. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2014.09.008>
- King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T. W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H. L., & Porreca, F. (2009). Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, 12(11), 1364–1366. <https://doi.org/10.1038/NN.2407>
- Konnova, E. A., Deftu, A. F., Chu Sin Chung, P., Pertin, M., Kirschmann, G., Decosterd, I., & Suter, M. R. (2023). Characterisation of GFAP-Expressing Glial Cells in the Dorsal Root Ganglion after Spared Nerve Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15559. <https://doi.org/10.3390/IJMS242115559/S1>
- Krebs-Kraft, D. L., Hill, M. N., Hillard, C. J., & McCarthy, M. M. (2010). Sex difference in cell proliferation in developing rat amygdala mediated by endocannabinoids has implications for social behavior. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005003107>
- Kumar, A., Negi, G., & Sharma, S. S. (2013). Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: concepts & mechanisms. *Curr Med Chem*, 20(36), 4640–4645.
- Kumar, A., & Sharma, S. S. (2010). NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(2), 360–365.
- Lacasse, A., Nguena Nguiefack, H. L., Page, G., Choinière, M., Samb, O. M., Katz, J., Ménard, N., Vissandjée, B., & Zerriouh, M. (2023). Sex and gender differences in healthcare utilisation trajectories: a cohort study among Quebec workers living with chronic pain. *BMJ Open*, 13(7). <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2022-070509>

- Ladak, A. A., Enam, S. A., & Ibrahim, M. T. (2019). A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. In *World Neurosurgery* (Vol. 131, pp. 126–132). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., Van Den Maagdenberg, A. M. J. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., & Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, *7*(6), 447–449. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1455>
- Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, *10*(9), 895–926. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2009.06.012>
- Ledeboer, A., Brevé, J. J. P., Wierinckx, A., Van Der Jagt, S., Bristow, A. F., Leysen, J. E., Tilders, F. J. H., & Van Dam, A. M. (2002). Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *European Journal of Neuroscience*, *16*(7), 1175–1185. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2002.02200.X>
- Ledeboer, A., Jekich, B. M., Sloane, E. M., Mahoney, J. H., Langer, S. J., Milligan, E. D., Martin, D., Maier, S. F., Johnson, K. W., Leinwand, L. A., Chavez, R. A., & Watkins, L. R. (2007). Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *21*(5), 686–698. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.012>
- Lee, K. T., Bulls, H. W., Hoogland, A. I., James, B. W., Colon-Echevarria, C. B., & Jim, H. S. L. (2024). Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): A Narrative Review and Proposed Theoretical Model. *Cancers 2024*, Vol. 16, Page 2571, *16*(14), 2571. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16142571>
- Lees, J. G., Makker, P. G. S., Tonkin, R. S., Abdulla, M., Park, S. B., Goldstein, D., & Moalem-Taylor, G. (2017). Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *European Journal of Cancer*, *73*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2016.12.006>
- Leiguarda, C., Potilinski, C., Rubione, J., Tate, P., Villar, M. J., Montaner, A., Bisagno, V., Constandil, L., & Brumovsky, P. R. (2021). IMT504 Provides Analgesia by Modulating Cell Infiltrate and Inflammatory Milieu in a Chronic Pain Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *16*(3), 651–666. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09971-2>
- Levine, A., Liktor-Busa, E., Lipinski, A. A., Couture, S., Balasubramanian, S., Aicher, S. A., Langlais, P. R., Vanderah, T. W., & Largent-Milnes, T. M. (2021). Sex differences in the expression of the endocannabinoid system within V1M cortex and PAG of Sprague Dawley rats. *Biology of Sex Differences*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S13293-021-00402-2>
- Liddell, J. R. (2017). Interplay between Nrf2 and NF-κB in Neuroinflammatory Diseases. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, *08*(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000489>
- Lieu, C., Kennedy, E. B., Bergsland, E., Berlin, J., George, T. J., Gill, S., Gold, P. J., Hantel, A., Jones, L., Mahmoud, N., Meyerhardt, J., Morris, A. M., Ruíz-García, E., Nancy You, Y., & Baxter, N. (2019). Duration of Oxaliplatin-Containing Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: ASCO Clinical

- Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 37(16), 1436–1447.
<https://doi.org/10.1200/JCO.19.00281>
- Lim, G., Sung, B., Ji, R. R., & Mao, J. (2003). Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain*, 105(1–2), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00242-2)
- Lim, H., Lee, H., Noh, K., & Lee, S. J. (2017). IKK/NF-κB-dependent satellite glia activation induces spinal cord microglia activation and neuropathic pain after nerve injury. *Pain*, 158(9), 1666–1677. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000000959>
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479–489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Li, Q., Powell, N., Zhang, H., Belevych, N., Ching, S., Chen, Q., Sheridan, J., Whitacre, A., & Quan, N. (2010). Endothelial IL-1R1 is a critical mediator of EAE pathogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(1), 160. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2010.09.009>
- Lithfous, S., Trocmet, L., Pebayle, T., Després, O., & Dufour, A. (2022). Investigating cold Aδ fibers in the 0–40 °C temperature range: A quantitative sensory testing and evoked potentials study. *Clinical Neurophysiology*, 134, 81–87. <https://doi.org/10.1016/J.CLINPH.2021.11.076>
- Liu, H., Mantyh, P. W., & Basbaum, A. I. (1997). NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature*, 386(6626), 721–724.
<https://doi.org/10.1038/386721A0>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, X., Botchway, B. O. A., Tan, X., Zhang, Y., & Fang, M. (2019). Resveratrol treatment of spinal cord injury in rat model. *Microscopy Research and Technique*, 82(3), 296–303.
<https://doi.org/10.1002/jemt.23171>
- Li, Y., Xi, C., Niu, M., Chi, Z., Liu, X., & Yan, J. (2011). Activation of satellite cells in the dorsal root ganglia in a disc-punctured rat model. *Journal of Orthopaedic Science*, 16(4), 433–438.
<https://doi.org/10.1007/S00776-011-0064-0>
- Lopez, M. S., Dempsey, R. J., & Vemuganti, R. (2015). Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury. In *Neurochemistry International* (Vol. 89, pp. 75–82). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.009>
- Loprinzi, C., Lacchetti, C., Bleeker, J., Cavaletti, G., Chauhan, C., Hertz, D. L., Kelley, M. R., Lavino, A., Lustberg, M. B., Paice, J. A., Schneider, B. P., Smith, E. M. L., Smith, M. Lou, Smith, T. J., Wagner-Johnston, N., & Dawn, L. H. (2020). Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 38(28), 3325–3348. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>
- Loprinzi, C. L. et al. (2020). Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*:

Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 38,28.

<https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>

- Luo, C., Gangadharan, V., Bali, K. K., Xie, R. G., Agarwal, N., Kurejova, M., Tappe-Theodor, A., Tegeder, I., Feil, S., Lewin, G., Polgar, E., Todd, A. J., Schlossmann, J., Hofmann, F., Liu, D. L., Hu, S. J., Feil, R., Kuner, T., & Kuner, R. (2012). Presynaptically localized cyclic GMP-dependent protein kinase 1 is a key determinant of spinal synaptic potentiation and pain hypersensitivity. *PLoS Biology*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001283>
- Luo, X., Chen, O., Wang, Z., Bang, S., Ji, J., Lee, S. H., Huh, Y., Furutani, K., He, Q., Tao, X., Ko, M. C., Bortsov, A., Donnelly, C. R., Chen, Y., Nackley, A., Berta, T., & Ji, R. R. (2021). IL-23/IL-17A/TRPV1 axis produces mechanical pain via macrophage-sensory neuron crosstalk in female mice. *Neuron*, 109(17), 2691-2706.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2021.06.015>
- Luo, X., Huh, Y., Bang, S., He, Q., Zhang, L., Matsuda, M., & Ji, R. R. (2019). Macrophage Toll-like Receptor 9 Contributes to Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain in Male Mice. *Journal of Neuroscience*, 39(35), 6848–6864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-18.2019>
- Lu, V. B., Ballanyi, K., Colmers, W. F., & Smith, P. A. (2007). Neuron type-specific effects of brain-derived neurotrophic factor in rat superficial dorsal horn and their relevance to 'central sensitization.' *The Journal of Physiology*, 584(Pt 2), 543. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2007.141267>
- Lux, S., Lobos, N., Lespay-Rebolledo, C., Salas-Huenuleo, E., Kogan, M. J., Flores, C., Pinto, M., Hernandez, A., Pelissier, T., & Constandil, L. (2019). The antinociceptive effect of resveratrol in bone cancer pain is inhibited by the Silent Information Regulator 1 inhibitor selisistat. *J Pharm Pharmacol*, doi:10.111.
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. In *Neuroscience Research* (Vol. 79, Issue 1, pp. 1–12). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>
- Lynch, J. J., Wade, C. L., Zhong, C. M., Mikusa, J. P., & Honore, P. (2004). Attenuation of mechanical allodynia by clinically utilized drugs in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. *Pain*, 110(1–2), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.03.010>
- Maia, H. J., Haddad, C., Pinheiro, N., & Casoy, J. (2012). Advantages of the association of resveratrol with oral contraceptives for management of endometriosis-related pain. *Int J Womens Health*, 4, 543–549.
- Majithia, N., Temkin, S. M., Ruddy, K. J., Beutler, A. S., Hershman, D. L., & Loprinzi, C. L. (2015). National Cancer Institute-supported chemotherapy-induced peripheral neuropathy trials: outcomes and lessons. *Supportive Care in Cancer : Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 24(3), 1439. <https://doi.org/10.1007/S00520-015-3063-4>
- Majithia, N., Temkin, S. M., Ruddy, K. J., Beutler, A. S., Hershman, D. L., & Loprinzi, C. L. (2016). National Cancer Institute-supported chemotherapy-induced peripheral neuropathy trials: outcomes and lessons. *Supportive Care in Cancer : Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 24(3), 1439–1447. <https://doi.org/10.1007/S00520-015-3063-4>

- Maldonado, R., Baños, J. E., & Cabañero, D. (2016). The endocannabinoid system and neuropathic pain. *PAIN*, *157*. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000428>
- Malvicini, M., Rizzo, M., Alaniz, L., Piñero, F., García, M., Atorrasagasti, C., Aquino, J. B., Rozados, V., Scharovsky, O. G., Matar, P., & Mazzolini, G. (2009). A novel synergistic combination of cyclophosphamide and gene transfer of interleukin-12 eradicates colorectal carcinoma in mice. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(23), 7256–7265. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1861>
- Mantyh, P. W., Clohisy, D. R., Koltzenburg, M., & Hunt, S. P. (2002). Molecular mechanisms of cancer pain. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(3), 201–209. <https://doi.org/10.1038/NRC747>
- Mapplebeck, J. C. S., Dalgarno, R., Tu, Y. S., Moriarty, O., Beggs, S., Kwok, C. H. T., Halievski, K., Assi, S., Mogil, J. S., Trang, T., & Salter, M. W. (2018). Microglial P2X4R-evoked pain hypersensitivity is sexually dimorphic in rats. *Pain*, *159*(9), 1752–1763. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001265>
- Martinez-Balibrea, E., Martínez-Cardus, A., Gines, A., Ruiz De Porras, V., Moutinho, C., Layos, L., Manzano, J. L., Buges, C., Bystrup, S., Esteller, M., & Abad, A. (2015). Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(8), 1767–1776. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0636/286858/P/TUMOR-RELATED-MOLECULAR-MECHANISMS-OF-OXALIPLATIN>
- Marwaha, L., Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Bhandari, R., & Kuhad, A. (2016). TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, *24*(6), 305–317. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0288-x>
- Masocha, W. (2018). Targeting the Endocannabinoid System for Prevention or Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: Studies in Animal Models. *Pain Research & Management*, *2018*, 5234943. <https://doi.org/10.1155/2018/5234943>
- Mattar, M., Umutoni, F., Hassan, M. A., Wamburu, M. W., Turner, R., Patton, J. S., Chen, X., & Lei, W. (2024). Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Recent Update on Pathophysiology and Treatment. *Life* *2024*, Vol. 14, Page 991, *14*(8), 991. <https://doi.org/10.3390/LIFE14080991>
- McCrary, M. J., Goldstein, D., Trinh, T., Timmins, H. C., Li, T., Friedlander, M., Bosco, A., Harrison, M., Maier, N., Fracp, N., & Park, S. B. (2019). Optimizing Clinical Screening for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal of Pain and Symptom Management*, *58*, 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2019.07.021>
- McGlone, F., & Reilly, D. (2010). The cutaneous sensory system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *34*(2), 148–159. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2009.08.004>
- Meng, H. Y., Shao, D. C., Li, H., Huang, X. D., Yang, G., Xu, B., & Niu, H. Y. (2018). Resveratrol improves neurological outcome and neuroinflammation following spinal cord injury through enhancing autophagy involving the AMPK/mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, *18*(2), 2237–2244. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9194>
- Meng, Q., Li, J., Wang, C., & Shan, A. (2023). Biological function of resveratrol and its application in animal production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *14*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/S40104-022-00822-Z>

- Meregalli, C., Canta, A., Carozzi, V. A., Chiorazzi, A., Oggioni, N., Gilardini, A., Ceresa, C., Avezza, F., Crippa, L., Marmioli, P., & Cavaletti, G. (2010). Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiological and pathological study in rats. *European Journal of Pain (London, England)*, *14*(4), 343–350. <https://doi.org/10.1016/J.EJPAIN.2009.07.001>
- Middleton, S. J., Perez-Sanchez, J., & Dawes, J. M. (2021). The structure of sensory afferent compartments in health and disease. *Journal of Anatomy*, *241*(5), 1186. <https://doi.org/10.1111/JOA.13544>
- Milosavljević, A., Jančić, J., Mirčić, A., Dožić, A., Boljanović, J., Milisavljević, M., & Četković, M. (2021). Morphological and functional characteristics of satellite glial cells in the peripheral nervous system. *Folia Morphologica (Poland)*, *80*(4), 745–755. <https://doi.org/10.5603/FM.A2020.0141>,
- Miltenburg, N. C., & Boogerd, W. (2014). Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treatment Reviews*, *40*(7), 872–882. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2014.04.004>
- Minnone, G., De Benedetti, F., Bracci-Laudiero, L., Fahnestock, M., & Martinowich, K. (2017). NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *International Journal of Molecular Sciences 2017, Vol. 18, Page 1028*, *18*(5), 1028. <https://doi.org/10.3390/IJMS18051028>
- Mitsuma, N., Yamamoto, M., Iijima, M., Hattori, N., Ito, Y., Tanaka, F., & Sobue, G. (2004). Wide range of lineages of cells expressing nerve growth factor mRNA in the nerve lesions of patients with vasculitic neuropathy: An implication of endoneurial macrophage for nerve regeneration. *Neuroscience*, *129*(1), 109–117. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2004.06.083>,
- Mizrahi, D., Park, S. B., Li, T., Timmins, H. C., Trinh, T., Au, K., Battaglini, E., Wyld, D., Henderson, R. D., Grimison, P., Ke, H., Geelan-Small, P., Marker, J., Wall, B., & Goldstein, D. (2021a). Hemoglobin, Body Mass Index, and Age as Risk Factors for Paclitaxel- and Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *JAMA Network Open*, *4*(2), E2036695. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2020.36695>
- Mizrahi, D., Park, S. B., Li, T., Timmins, H. C., Trinh, T., Au, K., Battaglini, E., Wyld, D., Henderson, R. D., Grimison, P., Ke, H., Geelan-Small, P., Marker, J., Wall, B., & Goldstein, D. (2021b). Hemoglobin, Body Mass Index, and Age as Risk Factors for Paclitaxel- and Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *JAMA Network Open*, *4*(2), E2036695. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.36695>
- Mizumura, K., & Murase, S. (2015). Role of nerve growth factor in pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *227*, 57–77. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_4,
- Moehring, F., Halder, P., Seal, R. P., & Stucky, C. L. (2018). Uncovering the Cells and Circuits of Touch in Normal and Pathological Settings. *Neuron*, *100*(2), 349–360. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.019>
- Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: Progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(4), 283–294. <https://doi.org/10.1038/nrn2606>
- Mogil, J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(12), 859–866. <https://doi.org/10.1038/NRN3360>

- Mogil, J. S. (2019). The translatability of pain across species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 374(1785).
<https://doi.org/10.1098/RSTB.2019.0286>
- Mogil, J. S. (2020a). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(7), 353–365. <https://doi.org/10.1038/S41583-020-0310-6>
- Mogil, J. S. (2020b). Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(7), 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0310-6>
- Mogil, J. S., & Chanda, M. L. (2005). The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain*, 117(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2005.06.020>
- Mogil, J. S., Parisien, M., Esfahani, S. J., & Diatchenko, L. (2024). Sex differences in mechanisms of pain hypersensitivity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 163.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2024.105749>
- Molassiotis, A., Cheng, H. L., Leung, K. T., Li, Y. C., Wong, K. H., Au, J. S. K., Sundar, R., Chan, A., Ng, T. R. De, Suen, L. K. P., Chan, C. W., Yorke, J., & Lopez, V. (2019). Risk factors for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients receiving taxane- and platinum-based chemotherapy. *Brain and Behavior*, 9(6). <https://doi.org/10.1002/BRB3.1312>
- Moraes, T. R., Veras, F. P., Barchuk, A. R., Nogueira, E. S. C., Kanashiro, A., & Galdino, G. (2024). Spinal HMGB1 participates in the early stages of paclitaxel-induced neuropathic pain via microglial TLR4 and RAGE activation. *Frontiers in Immunology*, 15.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1303937>,
- Mulpuri, Y., Marty, V. N., Munier, J. J., Mackie, K., Schmidt, B. L., Seltzman, H. H., & Spigelman, I. (2018). Synthetic peripherally-restricted cannabinoid suppresses chemotherapy-induced peripheral neuropathy pain symptoms by CB1 receptor activation. *Neuropharmacology*, 139, 85. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.07.002>
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Naji-Esfahani, H., Vaseghi, G., Safaeian, L., Pilehvarian, A.-A., Abed, A., Rafieian-Kopaei, M., & Vaseghi, G. (2016). Gender differences in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Laboratory Animals*, 50(1), 15–20.
<https://doi.org/10.1177/0023677215575863>
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14681–14686.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.95.25.14681>
- Nascimento, D., Pozza, D. H., Castro-Lopes, J. M., & Neto, F. L. (2011). Neuronal Injury Marker ATF-3 Is Induced in Primary Afferent Neurons of Monoarthritic Rats. *Neurosignals*, 19(4), 210–221.
<https://doi.org/10.1159/000330195>

- Navratilova, E., & Porreca, F. (2014). Reward and motivation in pain and pain relief. *Nature Neuroscience*, *17*(10), 1304–1312. <https://doi.org/10.1038/NN.3811>,
- Negus, S. S., Bilsky, E. J., Do Carmo, G. P., & Stevenson, G. W. (2010). Rationale and Methods for Assessment of Pain-Depressed Behavior in Preclinical Assays of Pain and Analgesia. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *617*, 79. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7_7
- Nessa, M. U., Beale, P., Chan, C., Yu, J. Q., & Huq, F. (2012). Combinations of resveratrol, cisplatin and oxaliplatin applied to human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, *32*(1), 53–59.
- Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 284, Issue 20, pp. 13291–13295). J Biol Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Ortiz-Rentería, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I., Simon, S. A., Hiriart, M., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(7), E1657–E1666. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715972115>
- Osborne, N. R., & Davis, K. D. (2022). Sex and gender differences in pain. *International Review of Neurobiology*, *164*, 277–307. <https://doi.org/10.1016/BS.IRN.2022.06.013>
- Özdemir, B. C., Gerard, C. L., & Espinosa Da Silva, C. (2022). Sex and Gender Differences in Anticancer Treatment Toxicity: A Call for Revisiting Drug Dosing in Oncology. *Endocrinology*, *163*(6). <https://doi.org/10.1210/ENDOCR/BQAC058>
- Papazian, I., Tsoukala, E., Boutou, A., Karamita, M., Kambas, K., Iliopoulou, L., Fischer, R., Kontermann, R. E., Denis, M. C., Kollias, G., Lassmann, H., & Probert, L. (2021). Fundamentally different roles of neuronal TNF receptors in CNS pathology: TNFR1 and IKK β promote microglial responses and tissue injury in demyelination while TNFR2 protects against excitotoxicity in mice. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 222. <https://doi.org/10.1186/S12974-021-02200-4>
- Park, S., Krishnan, A., Lin, C., Goldstein, D., Friedlander, M., & Kiernan, M. (2008). Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Current Medicinal Chemistry*, *15*(29), 3081–3094. <https://doi.org/10.2174/092986708786848569>
- Patapoutian, A., Tate, S., & Woolf, C. J. (2009). *Transient receptor potential channels: targeting pain at the source*. <https://doi.org/10.1038/nrd2757>
- Patil, M. J., Ruparel, S. B., Henry, M. A., & Akopian, A. N. (2013a). Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: Contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *305*(9), E1154. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00187.2013>
- Patil, M. J., Ruparel, S. B., Henry, M. A., & Akopian, A. N. (2013b). Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: Contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *305*, 1154–1164. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2013>

- Patterson, F. M., Miralami, R., Olivier, A. K., McNulty, K., Wood, J. W., Prabhu, R. K., & Priddy, L. B. (2022). Increase in serum nerve growth factor but not intervertebral disc degeneration following whole-body vibration in rats. *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)*, *100*, 105823. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOMECH.2022.105823>
- Payrits, M., SÁghy, É., Cseko, K., Pohóczky, K., Bölcseki, K., Ernszt, D., Barabás, K., Szolcsányi, J., Ábrahám, I. M., Helyes, Z., & Szoke, É. (2017). Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. *Endocrinology*, *158*(10), 3249–3258. <https://doi.org/10.1210/EN.2017-00101>
- Perl, E. R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(1), 71–80. <https://doi.org/10.1038/NRN2042>
- Perrin, F. E., Lacroix, S., Avilés-Trieueros, M., & David, S. (2005). Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α and interleukin-1 β Wallerian degeneration. *Brain*, *128*(4), 854–866. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWH407>,
- Pietrangeli, A., Leandri, M., Terzoli, E., Jandolo, B., & Garufi, C. (2006). Persistence of high-dose oxaliplatin-induced neuropathy at long-term follow-up. *European Neurology*, *56*(1), 13–16. <https://doi.org/10.1159/000094376>
- Pietro, V. Di, Yakoub, K. M., Caruso, G., Lazzarino, G. G., Signoretti, S., Barbey, A. K., Tavazzi, B., Lazzarino, G. G., Belli, A., & Amorini, A. M. (2020). Antioxidant therapies in traumatic brain injury. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 3, p. 260). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antiox9030260>
- Podratz, J. L., Knight, A. M., Ta, L. E., Staff, N. P., Gass, J. M., Genelin, K., Schlattau, A., Lathroum, L., & Windebank, A. J. (2011). Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiology of Disease*, *41*(3), 661–668. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2010.11.017>,
- Polgár, E., Bell, A. M., Gutierrez-Mecinas, M., Dickie, A. C., Akar, O., Costreie, M., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2020). Substance P-expressing Neurons in the Superficial Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord: Insights into Their Functions and their Roles in Synaptic Circuits. *Neuroscience*, *450*, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.038>
- Polomano, R. C., Mannes, A. J., Clark, U. S., & Bennett, G. J. (2001). A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*, *94*(3), 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00363-3)
- Porreca, F., & Dodick, D. W. (2023). Considering Patient Sex in Prescribing CGRP Receptor Antagonists for Short-Term Treatment of Migraine. *JAMA Neurology*, *80*(9), 885–886. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2023.2335>
- Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J. Y., Duarte, F. V, Montalvo, A. M., North, B. J., Agarwal, B., Ye, M., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., ... Sinclair, D. A. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*, *15*(5), 675–690.
- Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, *302*, 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>

- Qiang, M. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 53, pp. 401–426). Annu Rev Pharmacol Toxicol. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 2007 1:6, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020a). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001939>
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020b). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001939>
- Rakshith, H. T., Lohita, S., Rebello, A. P., Goudanavar, P. S., & Raghavendra Naveen, N. (2023). Sex differences in drug effects and/or toxicity in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 4. <https://doi.org/10.1016/J.CRPBAR.2022.100152>
- RANDALL, L. O., & SELITTO, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 111(4), 409–419. https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/13471093/A_method_for_measurement_of_analgesic_activity_on_inflamed_tissue_
- R Burstein, D Yarnitsky, I Goor-Aryeh, B J Ransil, & Z H Bajwa. (2000). An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann Neurol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10805332/>
- Ren, K., & Torres, R. (2008). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), 57. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2008.12.020>
- Renn, C. L., Carozzi, V. A., Rhee, P., Gallop, D., Dorsey, S. G., & Cavaletti, G. (2011). Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Molecular Pain*, 7, 29. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-29>
- Ross, D., & Siegel, D. (2017). Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Frontiers in Physiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00595>,
- Roughan, J. V., & Flecknell, P. A. (2001). Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain*, 90(1–2), 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00387-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00387-0)
- Roy, B., Das, A., Ashish, K., Bandyopadhyay, D., Maiti, A., Chakraborty, S., Stone, M. E., Philpotts, L. L., Nowak, R. J., & Patwa, H. S. (2019). Neuropathy with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: A meta-analysis. *Neurology*, 93(2), E143–E148. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007743>

- Rudjito, R., Agalave, N. M., Farinotti, A. B., Lundbäck, P., Szabo-Pardi, T. A., Price, T. J., Harris, H. E., Burton, M. D., & Svensson, C. I. (2020). Sex- and cell-dependent contribution of peripheral high mobility group box 1 and TLR4 in arthritis-induced pain. *Pain*, *162*(2), 459. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002034>
- Sagar, D. R., Burston, J. J., Woodhams, S. G., & Chapman, V. (2012). Dynamic changes to the endocannabinoid system in models of chronic pain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1607), 3300–3311. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0390>
- Saif, M. W., & Reardon, J. (2005). Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *1*(4), 249. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1661634/>
- Saika, F., Matsuzaki, S., Kobayashi, D., Ideguchi, Y., Nakamura, T. Y., Kishioka, S., & Kiguchi, N. (2020). Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 553787. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00925/BIBTEX>
- Saliba, S. W., Jauch, H., Gargouri, B., Keil, A., Hurrle, T., Volz, N., Mohr, F., van der Stelt, M., Bräse, S., & Fiebich, B. L. (2018). Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1362-7>
- Salter, M. W., & Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine*, *23*(9), 1018–1027. <https://doi.org/10.1038/NM.4397>,
- Sarkar, S., Aziz, Q., Woolf, C. J., Hobson, A. R., & Thompson, D. G. (2000). Contribution of central sensitisation to the development of noncardiac chest pain. *The Lancet*, *356*(9236), 1154–1159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02758-6)
- Scholz, J., Finnerup, N. B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K. D., Evers, S., First, M., Giamberardino, M. A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'Homme, P., Nicholas, M., ... Treede, R. D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*, *160*(1), 53–59. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001365>
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, *5* Suppl(11s), 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/NN942>
- Shao, H., Xue, Q., Zhang, F., Luo, Y., Zhu, H., Zhang, X., Zhang, H., Ding, W., & Yu, B. (2014). Spinal SIRT1 activation attenuates neuropathic pain in mice. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100938>,
- Shao, J., Yu, W., Wei, W., Wang, S., Zheng, Z., Li, L., Sun, Y., Zhang, J., Li, Z., Ren, X., Zang, W., & Cao, J. (2023). MAPK-ERK-CREB signaling pathway upregulates Nav1.6 in oxaliplatin-induced neuropathic pain in the rat. *Toxicology Letters*, *384*, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.07.010>
- Shen, Z., Li, W., Chang, W., Yue, N., & Yu, J. (2023). Sex differences in chronic pain-induced mental disorders: Mechanisms of cerebral circuitry. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1102808. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2023.1102808/PDF>

- Shichiri, M. (2014). The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 54(3), 151. <https://doi.org/10.3164/JCBN.14-10>
- Shin, S. M., Itson-Zoske, B., Cai, Y., Qiu, C., Pan, B., Stucky, C. L., Hogan, Q. H., & Yu, H. (2020). Satellite glial cells in sensory ganglia express functional transient receptor potential ankyrin 1 that is sensitized in neuropathic and inflammatory pain. *Molecular Pain*. <https://doi.org/10.1177/1744806920925425>
- Shirakawa, H., & Kaneko, S. (2018). Physiological and Pathophysiological Roles of Transient Receptor Potential Channels in Microglia-Related CNS Inflammatory Diseases. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 41, Issue 8).
- Shi, Z., Qiu, W., Xiao, G., Cheng, J., & Zhang, N. (2018). Resveratrol attenuates cognitive deficits of traumatic brain injury by activating p38 signaling in the brain. *Medical Science Monitor*, 24, 1097–1103. <https://doi.org/10.12659/MSM.909042>
- Siau, C., Xiao, W., & Bennett, G. J. (2006). Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Experimental Neurology*, 201(2), 507–514. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2006.05.007>
- Silva, J. R., Lopes, A. H., Talbot, J., Cecilio, N. T., Rossato, M. F., Silva, R. L., Souza, G. R., Silva, C. R., Lucas, G., Fonseca, B. A., Arruda, E., Alves-Filho, J. C., Cunha, F. de Q., & Cunha, T. M. (2017). Neuroimmune-Glia Interactions in the Sensory Ganglia Account for the Development of Acute Herpetic Neuralgia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(27), 6408–6422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2233-16.2017>
- Singh, A. P., Singh, R., Verma, S. S., Rai, V., Kaschula, C. H., Maiti, P., & Gupta, S. C. (2019). Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 1851–1891. <https://doi.org/10.1002/MED.21565>
- Sisignano, M., Baron, R., Scholich, K., & Geisslinger, G. (2014). Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. *Nature Reviews Neurology*, 10(12), 694–707. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2014.211>,
- Slivicki, R. A., Saberi, S. A., Iyer, V., Vemuri, V. K., Makriyannis, A., & Hohmann, A. G. (2018). Brain-Permeant and -Impermeant Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Synergize with the Opioid Analgesic Morphine to Suppress Chemotherapy-Induced Neuropathic Nociception Without Enhancing Effects of Morphine on Gastrointestinal Transit. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 367(3), 551. <https://doi.org/10.1124/JPET.118.252288>
- Smeriglio, A., Iraci, N., Denaro, M., Mandalari, G., Giofrè, S. V., & Trombetta, D. (2023). Synergistic Combination of Citrus Flavanones as Strong Antioxidant and COX-Inhibitor Agent. *Antioxidants*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antiox12040972>
- Smith, E., Pang, H., Cirrincione, C., Fleishman, S., Paskett, E. D., Ahles, T., Bressler, L. R., Fadul, C. E., Knox, C., Le-Lindqwister, N., Gilman, P. B., & Shapiro, C. L. (2013). Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*, 309(13), 1359–1367. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2013.2813>

- Smith, S. B., Crager, S. E., & Mogil, J. S. (2004). Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: Responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sciences*, *74*(21), 2593–2604. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2004.01.002>
- Smith, Y. R., Stohler, C. S., Nichols, T. E., Bueller, J. A., Koeppe, R. A., & Zubieta, J. K. (2006). Pronociceptive and Antinociceptive Effects of Estradiol through Endogenous Opioid Neurotransmission in Women. *The Journal of Neuroscience*, *26*(21), 5777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5223-05.2006>
- Snider, W. D., & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron*, *20*(4), 629–632. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81003-X)
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2009). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7. <https://doi.org/10.1007/S00401-009-0619-8>
- Sorge, R. E., Mapplebeck, J. C. S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J. K., Martin, L. J., Austin, J. S., Sotocinal, S. G., Chen, D., Yang, M., Shi, X. Q., Huang, H., Pillon, N. J., Bilan, P. J., Tu, Y., Klip, A., Ji, R. R., Zhang, J., ... Mogil, J. S. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, *18*(8), 1081–1083. <https://doi.org/10.1038/NN.4053>
- Sorge, R. E., & Strath, L. J. (2018). Sex differences in pain responses. *Current Opinion in Physiology*, *6*, 75–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.05.006>
- Soriano, D., Brumovsky, P. R., Villar, M. J., & Coronel, M. F. (2025). Early oral administration of THC:CBD formulations prevent pain-related behaviors without exacerbating paclitaxel-induced changes in weight, locomotion, and anxiety in a rat model of chemotherapy-induced neuropathy. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-025-06778-y>
- Soveri, L. M., Lamminmäki, A., Hänninen, U. A., Karhunen, M., Bono, P., & Osterlund, P. (2019). Long-term neuropathy and quality of life in colorectal cancer patients treated with oxaliplatin containing adjuvant chemotherapy. *Acta Oncologica*, *58*(4), 398–406. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1556804>
- Staff, N. P., Cavaletti, G., Islam, B., Lustberg, M., Psimaras, D., & Tamburin, S. (2019). Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS*, *24*(2), S26–S39. <https://doi.org/10.1111/jns.12335>
- Staff, N. P., Grisold, A., Grisold, W., & Windebank, A. J. (2017a). Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Current Review. *Annals of Neurology*, *81*(6), 772. <https://doi.org/10.1002/ANA.24951>
- Staff, N. P., Grisold, A., Grisold, W., & Windebank, A. J. (2017b). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Annals of Neurology*, *81*(6), 772–781. <https://doi.org/10.1002/ANA.24951>
- Staff, N. P., Grisold, A., Grisold, W., & Windebank, A. J. (2017c). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. In *Annals of Neurology* (Vol. 81, Issue 6, pp. 772–781). <https://doi.org/10.1002/ana.24951>
- Stahl, S. M. (2022). Chronic Pain and Its Treatment. *Stahl's Essential Psychopharmacology*, 379–400. <https://doi.org/10.1017/9781009053365.010>

- Starobova, H., & Vetter, I. (2017). Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience, 10*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00174>,
- Staurengo-Ferrari, L., Green, P. G., Araldi, D., Ferrari, L. F., Miaskowski, C., & Levine, J. D. (2021). Sexual dimorphism in the contribution of neuroendocrine stress axes to oxaliplatin-induced painful peripheral neuropathy. *Pain, 162*(3), 907–918. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002073>
- Storey, D. J., Sakala, M., McLean, C. M., Phillips, H. A., Dawson, L. K., Wall, L. R., Fallon, M. T., & Clive, S. (2010). Capecitabine combined with oxaliplatin (CapOx) in clinical practice: How significant is peripheral neuropathy? *Annals of Oncology, 21*(8), 1657–1661. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp594>
- Tamaki, N., Orihuela-Campos, R. C., Inagaki, Y., Fukui, M., Nagata, T., & Ito, H. (2014). Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radical Biol Med, 75*, 222–229.
- Tao, L., Ding, Q., Gao, C., & Sun, X. (2016). Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. *Int Immunopharmacol, 34*, 165–172.
- Tappe-Theodor, A., & Kuner, R. (2014a). Studying ongoing and spontaneous pain in rodents--challenges and opportunities. *The European Journal of Neuroscience, 39*(11), 1881–1890. <https://doi.org/10.1111/EJN.12643>
- Tappe-Theodor, A., & Kuner, R. (2014b). Studying ongoing and spontaneous pain in rodents - challenges and opportunities. *European Journal of Neuroscience, 39*(11), 1881–1890. <https://doi.org/10.1111/EJN.12643>,
- Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., Mendiboure, J., Pignon, J. P., Jooste, V., Van Endert, P., Ducreux, M., Zitvogel, L., Piard, F., & Kroemer, G. (2010). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene, 29*(4), 482–491. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.356>
- Thacker, M. A., Clark, A. K., Marchand, F., & McMahon, S. B. (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: Immune cells and molecules. *Anesthesia and Analgesia, 105*(3), 838–847. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000275190.42912.37>,
- Thomas, A., Okine, B. N., Finn, D. P., & Masocha, W. (2020). Peripheral deficiency and antiallodynic effects of 2-arachidonoyl glycerol in a mouse model of paclitaxel-induced neuropathic pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 129*, 110456. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110456>
- Tian, B., & Liu, J. (2020). Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 100, Issue 4, pp. 1392–1404). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10152>
- Tisdale, M. J. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. In *Journal of Supportive Oncology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 209–217).
- Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience, 11*(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/NRN2947>

- Toklu, H. Z., & Tümer, N. (2015). Oxidative stress, brain edema, blood-brain barrier permeability, and autonomic dysfunction from traumatic brain injury. In *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* (pp. 43–48). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/b18126>
- Ton, B. H. T., Chen, Q., Gaina, G., Tucureanu, C., Georgescu, A., Strungaru, C., Flonta, M. L., Sah, D., & Ristoiu, V. (2013). Activation profile of dorsal root ganglia Iba-1 (+) macrophages varies with the type of lesion in rats. *Acta Histochemica*, *115*(8), 840–850.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2013.04.007>
- Tracey, I., & Mantyh, P. W. (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, *55*(3), 377–391. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.07.012>
- Trecarichi, A., & Flatters, S. J. L. (2019). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International Review of Neurobiology*, *145*, 83–126. <https://doi.org/10.1016/BS.IRN.2019.05.001>,
- Trevisan, G., Benemei, S., Materazzi, S., De Logu, F., De Siena, G., Fusi, C., Fortes Rossato, M., Coppi, E., Marone, I. M., Ferreira, J., Geppetti, P., & Nassini, R. (2016). TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain : A Journal of Neurology*, *139*(Pt 5), 1361–1377. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW038>
- Trottier, E. D., Ali, S., Doré-Bergeron, M. J., & Chauvin-Kimoff, L. (2022). Best practices in pain assessment and management for children. *Paediatrics & Child Health*, *27*(7), 429–437.
<https://doi.org/10.1093/PCH/PXAC048>
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., & Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, *424*(6950), 778–783. <https://doi.org/10.1038/NATURE01786>
- Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Yonenobu, K., Ochi, T., & Noguchi, K. (2000). Activating Transcription Factor 3 (ATF3) Induction by Axotomy in Sensory and Motoneurons: A Novel Neuronal Marker of Nerve Injury. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *15*(2), 170–182. <https://doi.org/10.1006/MCNE.1999.0814>
- Üçeyler, N., Schäfers, M., & Sommer, C. (2009). Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Experimental Brain Research*, *196*(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/S00221-009-1755-Z>
- Uwah, A. N., Ackler, J., Leighton, J. C., Pomerantz, S., & Tester, W. (2012a). The effect of diabetes on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Clinical Colorectal Cancer*, *11*(4), 275–279.
<https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2012.05.002>
- Uwah, A. N., Ackler, J., Leighton, J. C., Pomerantz, S., & Tester, W. (2012b). The Effect of Diabetes on Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Clinical Colorectal Cancer*, *11*(4), 275–284.
<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2012.05.002>
- Velasco, R., & Bruna, J. (2010). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: An unresolved issue. *Neurología (English Edition)*, *25*(2), 116–131. [https://doi.org/10.1016/S2173-5808\(10\)70022-5](https://doi.org/10.1016/S2173-5808(10)70022-5)
- Velasco, R., Bruna, J., Briani, C., Argyriou, A. A., Cavaletti, G., Alberti, P., Frigeni, B., Cacciavillani, M., Lonardi, S., Cortinovis, D., Cazzaniga, M., Santos, C., & Kalofonos, H. P. (2014). Early predictors of oxaliplatin-induced cumulative neuropathy in colorectal cancer patients. *Journal of*

Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 85(4), 392–398. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2013-305334>

- Velasco, R., Domingo-Domenech, E., & Sureda, A. (2021). Brentuximab-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Multidisciplinary Approach to Manage an Emerging Challenge in Hodgkin Lymphoma Therapy. *Cancers*, 13(23), 6125. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13236125>
- Verkhatsky, A., Reyes, R. C., Parpura, V., Verkhatsky, A., Reyes, R. C., & Parpura, V. (2013). TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1. https://doi.org/10.1007/112_2013_15
- Vierck, C. J., Hansson, P. T., & Yeziarski, R. P. (2008). Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain*, 135(1–2), 7–10. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2007.12.008>
- Villalba-Riquelme, E., De La Torre-Martínez, R., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2022). Paclitaxel in vitro reversibly sensitizes the excitability of IB4(Δ) and IB4(+) sensory neurons from male and female rats Background and Purpose: Paclitaxel produces a chemotherapy-induced peripheral. <https://doi.org/10.1111/bph.15809>
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *Journal of Neuroscience*, 23(25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>,
- Wagner, M. A., Smith, E. M. L., Ayyash, N., & Holden, J. E. (2024). Prazosin as an Adjuvant to Increase Effectiveness of Duloxetine in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Seminars in Oncology Nursing*, 40(5). <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2024.151686>
- Wang, A. B., Housley, S. N., Flores, A. M., Kircher, S. M., Perreault, E. J., & Cope, T. C. (2021). A review of movement disorders in chemotherapy-induced neurotoxicity. In *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12984-021-00818-2>
- Wang, P., Jiang, L., Zhou, N., Zhou, H., Liu, H., Zhao, W., Zhang, H., Zhang, X., & Hu, Z. (2018). Resveratrol ameliorates autophagic flux to promote functional recovery in rats after spinal cord injury. *Oncotarget*, 9(9), 8427–8440. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23877>
- Wang, R. Y., Lin, X. L., Xiang, S. T., Sun, Q. H., & Ding, X. H. (2022). Risk factors for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 26(11), 4028–4043. https://doi.org/10.26355/EURREV_202206_28973
- Wan, W., Cao, L., Khanabdali, R., Kalionis, B., Tai, X., & Xia, S. (2016). The Emerging Role of HMGB1 in Neuropathic Pain: A Potential Therapeutic Target for Neuroinflammation. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/6430423>
- Ward, S. J., Lichtman, A. H., Piomelli, D., & Parker, L. A. (2021). *Cannabinoids and Cancer Chemotherapy-Associated Adverse Effects*. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgab007>
- Was, H., Borkowska, A., Bagues, A., Tu, L., Liu, J. Y. H., Lu, Z., Rudd, J. A., Nurgali, K., & Abalo, R. (2022). Mechanisms of Chemotherapy-Induced Neurotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 750507. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.750507/PDF>

- Wei, G., Gu, Z., Gu, J., Yu, J., Huang, X., Qin, F., Li, L., Ding, R., & Huo, J. (2021). Platinum accumulation in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 26(1), 35. <https://doi.org/10.1111/JNS.12432>
- Weissner, W., Winterson, B. J., Stuart-Tilley, A., Devor, M., & Bove, G. M. (2006). Time Course of Substance P Expression in Dorsal Root Ganglia Following Complete Spinal Nerve Transection. *The Journal of Comparative Neurology*, 497(1), 78. <https://doi.org/10.1002/CNE.20981>
- Wei, Z., Fei, Y., Su, W., & Chen, G. (2019). Emerging role of schwann cells in neuropathic pain: Receptors, glial mediators and myelination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 445946. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00116/BIBTEX>
- Williamson, A., & Hoggart, B. (2005). Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *Journal of Clinical Nursing*, 14(7), 798–804. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2702.2005.01121.X>
- Woodhams, S. G., Sagar, D. R., Burston, J. J., & Chapman, V. (2015). The role of the endocannabinoid system in pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 227, 119–143. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_7
- WOOLFE, G., & MACDONALD, A. D. (1944). THE EVALUATION OF THE ANALGESIC ACTION OF PETHIDINE HYDROCHLORIDE (DEMEROL). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 80(3), 300–307. [https://doi.org/10.1016/S0022-3565\(25\)09094-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3565(25)09094-9)
- Wu, J. M., & Hsieh, T. chen. (2011). Resveratrol: A cardioprotective substance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05854.x>
- Wyke, S. M., Russell, S. T., & Tisdale, M. J. (2004). Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF- κ B activation. *British Journal of Cancer*, 91(9), 1742–1750. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6602165>,
- Xiao, Q., Zhu, W., Feng, W., Lee, S. S., Leung, A. W., Shen, J., Gao, L., & Xu, C. (2019). A Review of Resveratrol as a Potent Chemoprotective and Synergistic Agent in Cancer Chemotherapy. *Front Pharmacol*, 9, 1534. doi: 10.3389/fphar.2018.01534. eCollection 2.
- Xiao, W. H., Zheng, H., & Bennett, G. J. (2012). Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience*, 203, 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.023>
- Xu, B. P., Yao, M., Li, Z. J., Tian, Z. R., Ye, J., Wang, Y. J., & Cui, X. J. (2020). Neurological recovery and antioxidant effects of resveratrol in rats with spinal cord injury: A meta-Analysis. *Neural Regeneration Research*, 15(3), 482–490. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266064>
- Yamamoto, S., & Egashira, N. (2021). Drug Repositioning for the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Mechanism- and Screening-Based Strategy. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 607780. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.607780>
- Yang, S., Xu, W., Feng, L., Zhang, C., Yan, C., Zhang, J., Lai, J., Yan, T., He, Z., Du, X., Du, Z., Luo, W., Huang, X., Wu, J., & Li, Y. (2022). Resveratrol Improves the Digestive Ability and the Intestinal Health of Siberian Sturgeon. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11977. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911977/S1>

- Yang, Y., Hu, L., Xia, Y. peng, Jiang, C. yi, Miao, C., Yang, C. qing, Yuan, M., & Wang, L. (2016). Resveratrol suppresses glial activation and alleviates trigeminal neuralgia via activation of AMPK. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/S12974-016-0550-6>
- Yang, Y., Luo, L., Cai, X., Fang, Y., Wang, J., Chen, G., Yang, J., Zhou, Q., Sun, X., Cheng, X., Yan, H., Lu, W., Hu, C., & Cao, P. (2018). Nrf2 inhibits oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via protection of mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*, *120*, 13–24. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.03.007>,
- Yoon, C., Young Wook, Y., Heung Sik, N., Sun Ho, K., & Jin Mo, C. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, *59*(3), 369–376. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90023-X)
- Yu, X., Basbaum, A., & Guan, Z. (2021). Contribution of colony-stimulating factor 1 to neuropathic pain. *Pain Reports*, *6*(1), E883. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000883>,
- Yu, X., Liu, H., Hamel, K. A., Morvan, M. G., Yu, S., Leff, J., Guan, Z., Braz, J. M., & Basbaum, A. I. (2020). Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-13839-2>
- Zedan, A. H., Hansen, T. F., Svenningsen, Å. F., & Vilholm, O. J. (2014). Oxaliplatin-Induced Neuropathy in Colorectal Cancer: Many Questions With Few Answers. *Clinical Colorectal Cancer*, *13*(2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2013.11.004>
- Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological Reviews*, *92*(1), 193–235. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00043.2010>
- Zhang, C., Li, H., & Han, R. (2020). An open-source video tracking system for mouse locomotor activity analysis. *BMC Research Notes*, *13*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-4916-6/FIGURES/3>
- Zhang, R. X., Li, A., Liu, B., Wang, L., Ren, K., Zhang, H., Berman, B. M., & Lao, L. (2007). IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *Pain*, *135*(3), 232. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2007.05.023>
- Zhang, Y., Gong, S., He, L., Zhou, M., Guo, J., Hoke, A., & Zhu, C. (2017). Nerve growth factor for neuropathic pain. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2017*(11), CD012800. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012800>
- Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2012). Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. In *Molecular Pain* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-55>
- Zhou, B., Caudal, A., Tang, X., Chavez, J. D., McMillen, T. S., Keller, A., Villet, O., Zhao, M., Liu, Y., Ritterhoff, J., Wang, P., Kolwicz, S. C., Wang, W., Bruce, J. E., & Tian, R. (2022). Upregulation of mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) mediates increased glycolysis in mouse hearts. *Journal of Clinical Investigation*, *132*(10). <https://doi.org/10.1172/JCI155333>

- Zhuang, Y., Huang, H., Liu, S., Liu, F., Tu, Q., Yin, Y., & He, S. (2021). Resveratrol Improves Growth Performance, Intestinal Morphology, and Microbiota Composition and Metabolism in Mice. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 726878. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.726878/BIBTEX>
- Zhu, L., Yang, M., Fan, L., Yan, Q., Zhang, L., Mu, P., & Lu, F. (2024). Interaction between resveratrol and SIRT1: role in neurodegenerative diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *398*(1). <https://doi.org/10.1007/S00210-024-03319-W>,
- Zhu, Y. F., & Henry, J. L. (2012). Excitability of A β sensory neurons is altered in an animal model of peripheral neuropathy. *BMC Neuroscience*, *13*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-15>
- Zieglgänsberger, W. (2018). Substance P and pain chronicity. *Cell and Tissue Research* *2018* *375*:1, *375*(1), 227–241. <https://doi.org/10.1007/S00441-018-2922-Y>
- Zimmer, Z., Fraser, K., Grol-Prokopczyk, H., & Zajacova, A. (2021). A global study of pain prevalence across 52 countries: examining the role of country-level contextual factors. *Pain*, *163*(9), 1740. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002557>
- Zordoky, B. N. M., Robertson, I. M., & Dyck, J. R. B. (2015). Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*, *1852*, 1155–1177.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, *90*(3), 405–413. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80501-2)
- Zribi, A., Ben Nasr, S., Hamdi, S., Ayari, J., Fendri, S., Balti, M., & Haddaoui, A. (2020a). Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy risk factors and management in Tunisian population. *The Pan African Medical Journal*, *35*. <https://doi.org/10.11604/PAMJ.2020.35.83.18357>
- Zribi, A., Ben Nasr, S., Hamdi, S., Ayari, J., Fendri, S., Balti, M., & Haddaoui, A. (2020b). Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy risk factors and management in Tunisian population. *The Pan African Medical Journal*, *35*. <https://doi.org/10.11604/PAMJ.2020.35.83.18357>
- Zubieta, J. K., Smith, Y. R., Bueller, J. A., Xu, Y., Kilbourn, M. R., Jewett, D. M., Meyer, C. R., Koeppe, R. A., & Stohler, C. S. (2002). μ -opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(12), 5100–5107. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-05100.2002>