



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS P75 EN MODELO MURINO DE DOLOR NEUROPÁTICO

POR SOFÍA BELÉN RECABARREN CANCINO

Plan de trabajo de Tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía:

Dra. Viviana Ivonne Pérez Fernández
Depto. de Fisiología

Profesor Patrocinante:

Dra. Viviana Ivonne Pérez Fernández
Depto. de Fisiología

Marzo, 2024

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mi hermana y mi codita, quienes me han brindado apoyo incondicional desde el inicio de mi formación profesional. A ustedes va dedicado todo mi esfuerzo. Jamás habrá páginas suficientes para expresar el infinito amor hacia ustedes.

A mis amigos que me acompañaron durante esta etapa. Vale, Monse, Alex, Karina, Noe, Romi y Ricardo, gracias por hacer más feliz mi vida universitaria y por enseñarme la verdadera definición de amistad incondicional.

A mi tutora, Dra Viviana Pérez Fernández. Gracias por su contribución en mi formación profesional y personal, por enseñarme a ser metódica, resiliente y disciplinada. Gracias por darme la oportunidad de ser su primera alumna y amar mucho más la ciencia. Es mi mayor inspiración de mujer científica.

A todo el team Pain. Gracias por siempre tener la voluntad de ayudarme, por el tiempo de escuchar mis presentaciones y por su compañía. Mi admiración hacia ustedes es inmensa.

Al laboratorio de Fisiología de la Universidad de Concepción, por abrirme las puertas para realizar mi tesis.

A mi Panchi, quien me inspira a lograr mis objetivos. Gracias por tu inmenso amor y por ser mi mayor soporte este último tiempo.

A todos quienes facilitaron este proceso, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	3
3	INTRODUCCIÓN	4
3.1	Nocicepción y dolor	4
3.2	Dolor crónico	8
3.3	Dolor neuropático	10
3.4	Neurotrofinas y sus receptores	13
3.5	Neurotrofinas en dolor crónico y dolor neuropático	18
3.6	Receptor de neurotrofina p75	20
3.7	P75 en dolor crónico y dolor neuropático	24
4	PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
5	HIPÓTESIS	28
6	OBJETIVOS	29
6.1	Objetivo general:	29
6.2	Objetivos específicos:	29
7	MATERIALES	30
7.1	Animales de experimentación	30
7.2	Anticuerpos	30
7.3	Secuencia de partidores de neurotrofinas y sus receptores	33
7.4	Reactivos y soluciones en general	35
7.5	Kits comerciales	36
7.6	Materiales en general y equipos disponibles	36
8	MÉTODOS	38
8.1	Modelo de dolor neuropático	38
8.2	Test de Von Frey	39
8.3	Western Blot	40
8.3.1	Extractos de proteínas totales en médula espinal.	40
8.3.2	Extractos de proteínas totales de la zona dorsal de la médula espinal	40
8.3.3	Cuantificación de proteínas	41

8.3.4	Electroforesis de proteínas.....	41
8.3.5	Transferencia a membrana de PVDF.	42
8.3.6	Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado.....	42
8.3.7	Cuantificación de la intensidad de las bandas.....	43
8.4	PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR).....	44
8.4.1	Extractos de médula espinal	44
8.4.2	Extracción de ARN total de médula espinal.....	44
8.4.3	Cuantificación de ARN total.....	45
8.4.4	Obtención de ADNc a partir de ARN total por RT-PCR.....	45
8.4.5	Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR).....	46
8.5	Inmunohistoquímica	47
8.5.1	Obtención de las muestras.....	47
8.5.2	Inmunohistoquímica de médula espinal	48
8.6	Análisis y procesamiento de imágenes.....	49
8.6.1	Adquisición de imágenes	49
8.6.2	Procesamiento de imágenes	49
8.7	Análisis estadístico	49
9	RESULTADOS	51
9.1	Modelo de dolor neuropático por constricción del nervio ciático (CCI) causa hipersensibilidad mecánica.	51
9.2	Evaluación de la expresión proteica del receptor de neurotrofina p75 en médula espinal en dolor neuropático.	55
9.3	Expresión relativa del ARNm del receptor de neurotrofina p75 en modelo murino de dolor neuropático.	65
9.4	Localización del receptor de neurotrofinas p75 en distintos tipos celulares presentes en médula espinal de un modelo de dolor neuropático. .	70
10	DISCUSIÓN	80
10.1	Efecto del modelo de dolor neuropático por constricción del nervio ciático en ratones.	81
10.2	Caracterización de neurotrofinas y sus receptores de alta afinidad en dolor neuropático.....	84

10.3	Receptor de neurotrofina p75 incrementa su expresión en médula espinal en dolor neuropático.....	88
11	CONCLUSIÓN	94
12	ANEXO	96
13	GLOSARIO	101
14	BIBLIOGRAFÍA	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematización anatómica de la vía nociceptiva.	6
Figura 2. Esquematización de la unión de neurotrofinas junto a sus respectivos receptores.....	14
Figura 3. Esquematización de la activación de receptores de neurotrofinas junto a señalización intracelular desencadenada por su activación.	16
Figura 4. Esquematización de la estructura del receptor de neurotrofina p75 y sus correceptores Trks, Sortilina, Nogo y Lingo-1.	22
Figura 5. Incremento del umbral mecánico en la pata izquierda de los animales CCI54	
Figura 6. Variación en la expresión proteica de p75, BDNF, TrkB y TrkA en zona lumbar de médula espinal.	60
Figura 7. Variación en la expresión proteica de JNK y p-ERK en zona lumbar de médula espinal.	61
Figura 8. Variación de la expresión proteica de p75, BDNF, TrkB y TrkA en el asta dorsal de la zona lumbar en la médula espinal.....	63
Figura 9. Variación de la expresión proteica de p-ERK y p-JNK en el asta dorsal de la zona lumbar en la médula espinal.	64
Figura 10. Expresión relativa del ARNm de las neurotrofinas NGF y BDNF, junto a sus receptores p75, TrkA y TrkB en la zona lumbar de la médula espinal.	69
Figura 11. El receptor de neurotrofina p75 no se co-expresa en neuronas del asta dorsal en la médula espinal.....	74
Figura 12. El receptor de neurotrofina p75 no co-localiza con astrocitos en el asta dorsal de la médula espinal.....	76
Figura 13. El receptor de neurotrofina p75 co-localiza con microglía en el asta dorsal de la médula espinal.	78
Figura 14. BDNF incrementa su expresión en la médula espinal luego de la ligación del nervio ciático, mas no su receptor de alta afinidad TrkB.....	79
Figura 15. Resumen gráfico de los principales datos obtenidos de la caracterización de p75.....	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en los diferentes experimentos.....	31
Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados.	32
Tabla 3. Partidores utilizados en qPCR.	34
Tabla 4. Extracción ARN total zona lumbar de la médula espinal	67

1 RESUMEN

El dolor neuropático, una aflicción con impacto significativo en la calidad de vida de los pacientes, surge de una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial. La señalización molecular del dolor crónico ha sido vinculada con alteraciones en la expresión y función de neurotrofinas y sus receptores Trks y p75, de alta y baja afinidad respectivamente. Durante el dolor neuropático, incrementa la expresión de neurotrofinas junto a sus receptores específicos Trks. Sin embargo, aun cuando existe evidencia que relaciona la participación de p75 en la regulación neurofisiológica del dolor, su estudio no ha sido ampliamente abordado.

Esta investigación caracterizó la expresión y función del receptor p75 durante el dolor neuropático en modelos murinos, enfocándose principalmente en los cambios moleculares que ocurren en la medula espinal. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de la expresión de p75 en la médula espinal, la expresión de este receptor en las láminas más externas del asta dorsal y la activación de proteínas ERK, implicadas en la mantención del dolor neuropático a través del tiempo.

Al comprender la participación del receptor p75 en la neurofisiología del dolor, se busca contribuir al estudio de las neurotrofinas en el dolor neuropático y colaborar

en la propuesta de nuevos blancos terapéuticos para la neurofarmacología del dolor.

2 ABSTRACT

Neuropathic pain, an affliction with significant impact on patients' quality of life, arises from injury or disease of the somatosensory system. Molecular signalling in chronic pain has been linked to alterations in the expression and function of neurotrophins and their high- and low-affinity receptors Trks and p75, respectively. During neuropathic pain, neurotrophin expression increases along with their specific Trks receptors. However, although there is evidence linking the involvement of p75 in the neurophysiological regulation of pain, its study has not been widely addressed. This research characterised the expression and function of the p75 receptor during neuropathic pain in murine models, focusing mainly on the molecular changes that occur in the spinal cord. The results obtained showed an increase in p75 expression in the spinal cord, the expression of this receptor in the outermost laminae of the dorsal horn and the activation of ERK proteins, which are involved in the maintenance of neuropathic pain over time. By understanding the participation of the p75 receptor in the neurophysiology of pain, we aim to contribute to the study of neurotrophins in neuropathic pain and collaborate in the proposal of new therapeutic targets for the neuropharmacology of pain.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Nocicepción y dolor

Nocicepción se describe como la codificación y procesamiento de estímulos nocivos desde la periferia hacia el sistema nervioso central (Bell, 2018); tarea fundamental para la supervivencia y protección del organismo (W. Daniel Tracey, 2017). La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial, descrita en términos de dicho daño” (Vader et al., 2021). Por lo tanto, a diferencia de la nocicepción incluye tanto la participación de regiones cerebrales involucradas en el estado afectivo y emocional, como la percepción de estímulos dañinos a través de mecanismos nociceptivos (Loeser & Melzack, 1999).

Los estímulos nocivos son censados por fibras aferentes sensitivas presentes en tejidos de barrera como la piel, músculos o vísceras, quienes activan cascadas de señalización molecular y neurofisiológicas para la percepción del dolor agudo cuya función principal es protectora frente a cualquier injuria (Millan et al., 1999). Las fibras aferentes tienen la capacidad de detectar estímulos mecánicos, térmicos y químicos con intensidades en el rango nocivo (Tracey et al., 2017). Existen dos clases principales de fibras nociceptoras. Las primeras denominadas

aferentes mielinizadas de diámetro medio (A δ), responsables de la transmisión de estímulos lesivos rápidos y localizados, mientras que las segundas son fibras C amielínicas, las cuales transmiten estímulos nocivos lentos y poco localizados (Bell, 2018).

Ambas se caracterizan por ser neuronas pseudounipolares que albergan su soma principalmente en los ganglios de la raíz dorsal (GRD); ubicados adyacentemente a lo largo de la médula espinal de manera bilateral (Esposito et al., 2019). Este tipo de neuronas poseen dos ramas axonales, una periférica aferente, innervando un tejido diana y una rama axonal terminal que conecta con el asta dorsal de la médula espinal (Berger et al., 2021) (Figura 1). La región dorsal se subdivide en seis secciones denominadas “láminas”, y es principalmente, en la lámina I y II donde se proyectan los axones terminales de las fibras nociceptoras. Desde ahí hacen sinapsis con neuronas de segundo orden para el procesamiento de estímulos nocivos en el sistema nervioso central (SNC), particularmente en el tálamo, la corteza, la amígdala, entre otras estructuras que darán el componente emocional y consciente del dolor (Basbaum et al., 2009; Bell, 2018; Pak et al., 2018).

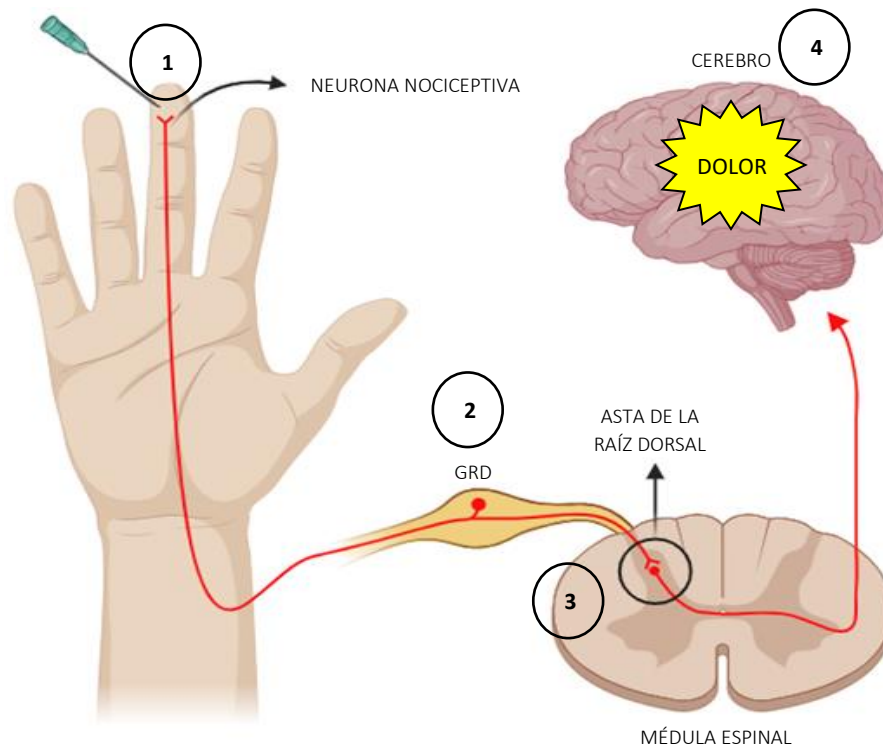


Figura 1. Esquematización anatómica de la vía nociceptiva.

Esquematización anatómica de neuronas sensitivas presentes en tejidos de barrera como piel, viseras, músculos, entre otros. (1) Axones aferentes de neuronas sensitivas pseudounipolares captan estímulos en el rango nocivo. (2) Ganglio de la raíz dorsal alberga los somas neuronales de las neuronas sensitivas. (3) Asta de la raíz dorsal de la médula espinal, recibe los axones terminales de las neuronas sensitivas en las láminas I y II, además de conectar con neuronas de segundo orden. (4) Cerebro, zona donde se procesan los estímulos nocivos y se percibe el dolor. Modificado de: Basbaum et al., 2009; BioRender Templates, 2024).

Las neuronas sensoriales poseen complejos mecanismos moleculares que permiten la transducción de los estímulos lesivos (Bell, 2018). Entre estos se encuentra la liberación de moléculas desde la periferia como neurotransmisores, citoquinas, factores neurotróficos, iones y péptidos tales como la sustancia P y el péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP) (Basbaum et al., 2009; Pak et al., 2018). Algunas de estas pueden estimular directamente las neuronas sensitivas mediante la apertura de canales iónicos y otras pueden inducir cambios moleculares mediante la regulación y expresión de genes involucrados en la nocicepción (Basbaum et al., 2009).

Particularmente, los cambios moleculares en las neuronas sensoriales son inducidos por la interacción de los ligandos anteriormente mencionado junto a receptores de membrana, ya sea acoplados a proteína G, tirosina quinasa o canales iónicos activados por voltaje o neurotransmisores (Y;Lee, 2022). Esta interacción ligando-receptor transduce estímulos nocivos en los GRD para luego transmitirlos al SNC (Basbaum et al., 2009). No obstante, aún no se tiene una visión completa sobre la integración de estímulos lesivos en la médula espinal, aunque es un sitio de gran modulación de la información sensorial antes de proyectarse al cerebro (Bell, 2018). Por lo tanto, resulta esencial entender los mecanismos moleculares involucrados en el procesamiento de nocicepción para el desarrollo y la posible mantención en el tiempo de este.

3.2 Dolor crónico

A diferencia del dolor agudo, el dolor crónico no posee una función fisiológica y se define como una hipersensibilidad al dolor que perdura por más de 3 meses (Treede et al., 2015). Esta patología puede ser desencadenada por estímulos específicos o estados patológicos y su sintomatología más común es la respuesta exacerbada a estímulos dolorosos (hiperalgesia) y/o respuestas dolorosas frente a estímulos inocuos (alodinia) (Chiu et al., 2012).

Según la nueva revisión de la clasificación internacional de enfermedades (CIE-11) que comenzó a regir el año 2022, se incorporó al dolor crónico como una enfermedad propiamente tal (Nugraha et al., 2019), donde la prevalencia en la población Europea es de un 20% (Treede et al., 2015) mientras que, en Chile, el dolor crónico no oncológico engloba aproximadamente al 34,7% de la población (Durán et al., 2023).

Dentro de los diferentes tipos de dolor crónico destacan: el dolor crónico inflamatorio; aquel relacionado a cáncer; posquirúrgico o postraumático; dolor musculoesquelético crónico; dolor orofacial crónico y dolor neuropático (Treede et al., 2019). Este último de particular relevancia por su alta prevalencia en Chile y el mundo (Scholz et al., 2019).

Hasta ahora, no se entienden del todo los eventos precisos que desencadenan el desarrollo y mantenimiento de los distintos tipos de dolor crónico. Sin embargo, gran cantidad de evidencia indica que los estados de esta patología se relacionan con cambios plásticos en los sitios anatómicos que participan en la vías del dolor (Cohen et al., 2021). Específicamente cambios a nivel celular y molecular en áreas espinales y cerebrales, incluyendo efectos a nivel de expresión génica en neuronas sensoriales (Descalzi et al., 2015).

Para entender mejor estas adaptaciones celulares y moleculares se han utilizado varios modelos animales de dolor crónico (Abboud et al., 2021). Un ejemplo de ello son los modelos de dolor crónico inflamatorio, caracterizados por usar inyecciones subcutáneas de agentes que promueven inflamación como formalina, capsaicina o adyuvante completo de Freund (CFA). Estos provocan una lesión tisular que puede durar hasta 2 semanas (Descalzi et al., 2015), por lo tanto, se considera un modelo válido para estudiar enfermedades como artritis reumática (AR) ya que favorece la liberación de mediadores proinflamatorios asociados al desarrollo de la patología (Abboud et al., 2021).

Por otro lado, existen modelos animales que permiten la evaluación del dolor crónico neuropático a través de la lesión de nervios periféricos. Uno de los modelos de dolor crónico neuropático más utilizado es el modelo de lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático (Amteshwar Singh Jaggi et al., 2011;

Abboud et al., 2021). Este consta en la triple ligadura del nervio provocando dolor espontáneo e hipersensibilidad al tacto durante al menos 7 semanas (Abboud et al., 2021).

El tipo de daño causado por la constricción del nervio ciático homóloga trastornos neurológicos como edema intraneural, isquemia focal y degeneración walleriana (Abboud et al., 2021; Amteshwar et al., 2011; Challa et al, 2014; Meacham et al., 2017), por lo que resulta altamente útil utilizar modelos murinos para el análisis de mecanismos involucrados en este tipo de patología.

Aunque el desarrollo de modelos animales ha sido fundamental para la comprensión de los distintos tipos de dolor crónico; el conocimiento molecular y celular que contribuyen a su mantención sigue siendo incompleto, sobre todo en modelos de dolor crónico neuropático. Es por eso, que resulta relevante contribuir al conocimiento de la neurofisiopatología de esta enfermedad.

3.3 Dolor neuropático

El dolor neuropático (DN) se define por la IASP como “dolor que surge por consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial”. En Chile, tiene una incidencia del 12% del total los casos de dolor crónico con sintomatología como ardor continuo, dolor por presión, sensaciones de descarga eléctrica y alodinia mecánica (Vader et al.,

2021). Desafortunadamente, los fármacos utilizados actualmente para tratar DN han tenido un éxito limitado con poca o ninguna respuesta frente analgésicos de uso común como AINES y opiáceos (Amteshwar Singh Jaggi et al., 2011), por lo cual resulta relevante conocer los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

Esta patología se origina por diferentes causas, dentro de las cuales destacan neuropatías periféricas dolorosas, neuralgias postherpéticas, lesión nerviosa traumática, lesiones traumáticas en médula espinal, dolor asociado a esclerosis múltiple, entre otras (Scholz et al., 2019). Sin embargo, cualquiera sea el origen, amplia evidencia ha señalado que el daño de las fibras nociceptivas ya sea por trauma, compresión, hipoxia o inflamación, genera degeneración de los axones junto a alteraciones en la expresión, tráfico y localización periférica de distintos canales iónicos, neurotransmisores y proteínas de membrana implicadas en la fisiopatología del dolor (Meacham et al., 2017). En esta dirección, el daño en los nervios periféricos incrementa mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6, prostaglandinas o el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales favorecen la función de canales de sodio conduciendo una mayor excitabilidad neuronal (Bannister et al., 2020). Junto a esto, el mayor flujo de calcio intracelular luego de una lesión periférica produce una sobreexpresión de ciertos canales de calcio voltaje dependientes, incrementando la liberación de neurotransmisores excitatorios (Alles & Smith, 2018).

Por otro lado, no sólo canales iónicos han sido descritos en el desarrollo del DN, si no que, la liberación de factores neurotróficos desde la periferia hacia el SNC también puede contribuir a cambios neuroplásticos que desarrollan y mantienen la patología (Sun et al., 2021). De hecho, el factor de crecimiento nervioso (NGF) es capaz de regular al alza la expresión de canales de sodio regulados por voltaje en los estados de DN, lo cual está críticamente relacionado con la sensibilización de las fibras nociceptoras (Siniscalco et al., 2011). Además, la sobreexpresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) regula a la baja la expresión del exportador de cloruro de potasio (KCC2), acumulando Cl^- intracelular. Esto se traduce en el cambio de corrientes GABAérgicas normalmente inhibitorias a corrientes excitatorias, reduciendo los umbrales del dolor frente a estímulos que no son lesivos (Alles & Smith, 2018).

En este marco, distintos estudios muestran que las neurotrofinas se relacionan directamente con la inducción de sintomatología característica del dolor neuropático, como lo es la hiperalgesia. No obstante, aunque se ha indicado la contribución de los factores neurotróficos en estados fisiopatológicos del DN, aún no se conocen a cabalidad los mecanismos por los cuales, estas proteínas y sus receptores, podrían contribuir en el desarrollo y/o mantención de esta enfermedad.

3.4 Neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas pertenecen a una familia de factores del crecimiento y son importantes reguladoras de la función neuronal, participando en el desarrollo, diferenciación, supervivencia celular y estados fisiopatológicos en el sistema nervioso central y periférico (Huang & Reichardt, 2001).

En mamíferos hay cuatro ligandos que componen esta familia. El factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4), las cuales son sintetizadas mayormente por neuronas y glía (Palasz et al., 2020), aunque también se expresan en células inmunes como mastocitos y linfocitos entre otros tejidos periféricos (Pérez et al., 2019; Vega et al., 2003). Las neurotrofinas son sintetizadas en el retículo endoplasmático en la forma de precursor de pro-neurotrofina (ProNT), el cual es clivado proteolíticamente produciendo la forma madura del ligando para luego ser liberado al espacio extracelular (Seidah et al. 1996; Mowla et al. 2001). Así mismo, su forma inmadura, proNT, también puede ser liberada desde la célula, gatillando mecanismos moleculares diferentes a los inducidos por neurotrofinas maduras (Lewin & Nykjaer, 2014).

Estas proteínas, interactúan con dos tipos de receptores en la superficie celular que median sus acciones; la familia Trks (TrkA, TrkB y TrkC), receptores tirosina quinasa de alta afinidad al ligando y el receptor de neurotrofina p75 de baja

afinidad (p75NTR). Específicamente NGF se une a TrkA; BDNF junto a NT-4 se unen a TrkB; y NT-3 señaliza a través de TrkC. Por otra parte, el receptor de neurotrofinas p75 tiene la capacidad de ser activado y transducir señales mediante la unión a todas las neurotrofinas tanto en su forma madura como inmadura (proNT) (Allen & Dawbarn, 2006) (Figura 2).

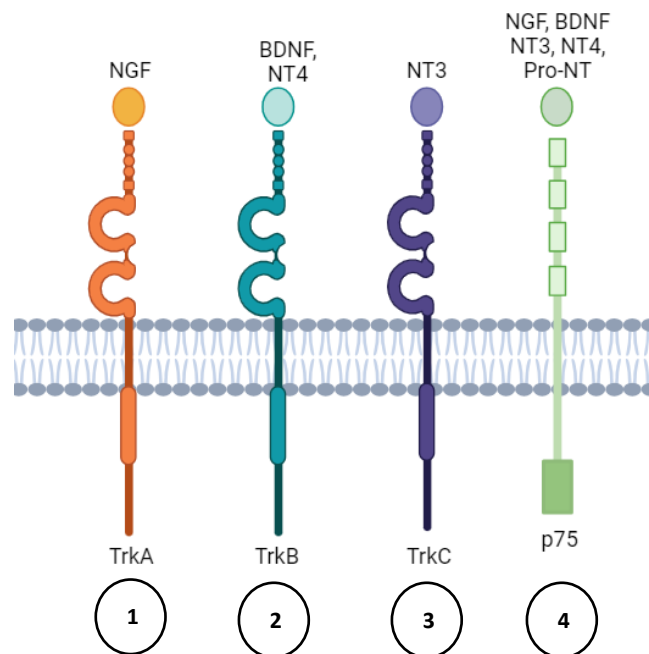


Figura 2. Esquematización de la unión de neurotrofinas junto a sus

respectivos receptores. Neurotrofinas interactúan con dos tipos de

receptores de membrana, Trks, receptores tirosina quinasa de alta afinidad y p75, receptor perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral de baja afinidad.

(1) Receptor TrkA de alta afinidad de unión a NGF. (2) Receptor TrkB de alta afinidad de unión a BDNF y NT-4. (3) Receptor TrkC de alta afinidad de unión a NT-3. (4) Receptor de baja afinidad p75, capaz de unir a todas las neurotrofinas,

incluidas sus proformas. Modificado de: (Pezet, 2014; BioRender Templates, 2024)

La unión de estos ligandos homodiméricos a su receptor de alta afinidad, Trk, permite la dimerización de este, generando autofosforilación y la activación de señalizaciones intracelulares (Figura 3.). Entre ellas se encuentran vías mediadas por la activación de ERK quinasa, PI3K y fosfolipasa C (PLC). Esta señalización hacia el interior de la célula, activada por las rutas anteriormente descritas, se traducirá en la regulación de la actividad transcripcional. Un ejemplo de esto es la inducción del factor de transcripción CREB, el cual tiene efectos sobre el ciclo celular, promueve la supervivencia celular, crecimiento de neuritas y plasticidad sináptica (Friedman 2010, Ceni et al. 2014, Meeker and Williams 2014).

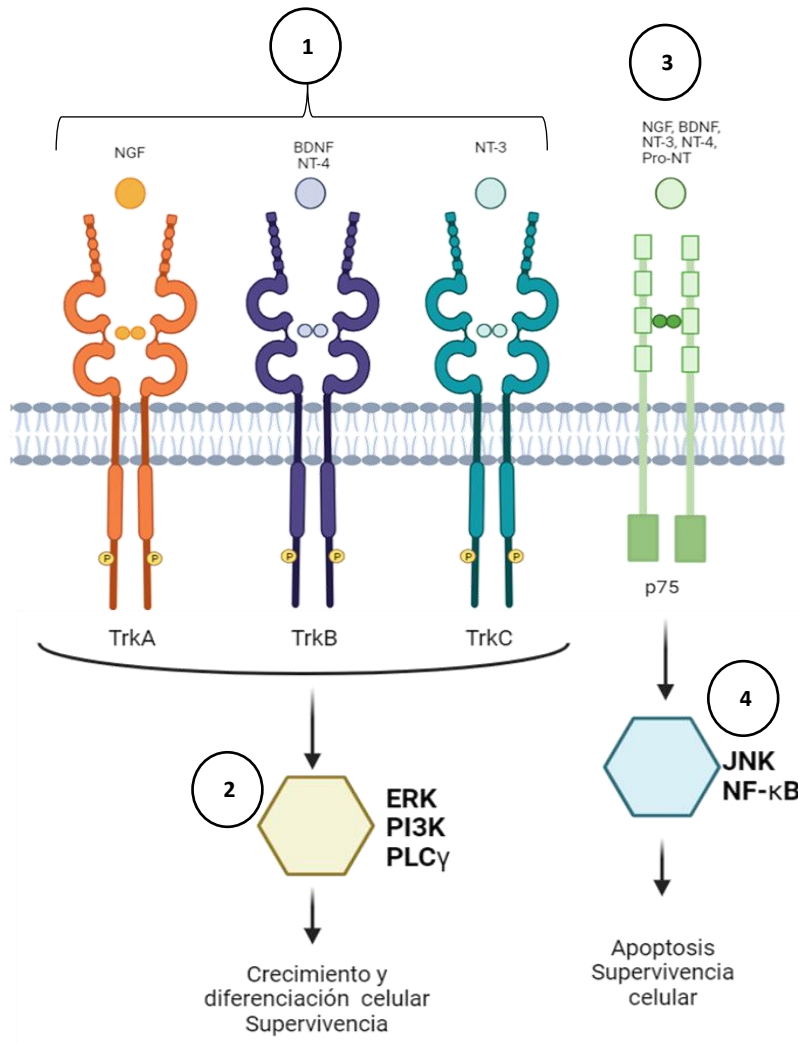


Figura 3. Esquematización de la activación de receptores de neurotrofinas junto a señalización intracelular desencadenada por su activación.

Dimerización de los receptores Trks, a través de dímeros de neurotrofinas, permite la activación de dichos receptores a través de la autofosforilación, desencadenando distintas vías de señalización intracelular. Por otro lado, p75 no tiene actividad catalítica y desde su dominio intracelular puede interactuar con

diversas proteínas que permiten su funcionamiento, provocando la activación de cascadas de señalización intracelular. (1) Receptores Trks (TrkA, TrkB y TrkC) dimerizados y activos por la unión de dímeros de neurotrofinas. (2) Señalización intracelular desencadenada por la activación de receptores Trks a través de la unión de neurotrofinas. (3) Receptor p75 dimerizado y activo por la unión de dímeros de neurotrofinas. (4) Señalización intracelular desencadenada por la activación p75 a través de la unión de neurotrofinas. Modificado de: Meeker and Williams 2014; BioRender Templates, 2024).

Por otra parte, el receptor p75 puede señalizar uniéndose como correceptor junto a todos los receptores Trks; unido a otros receptores celulares como Sortilina, Lingo y Nogo; o puede gatillar mecanismos moleculares independiente de la asociación a otros receptores (Meabon et al., 2015; Meeker and Williams 2014). De esta manera, la señalización desencadenada por la activación de p75 es amplia y variada, regulando procesos que van desde la muerte celular programada hasta la supervivencia neuronal (Underwood & Coulson, 2008). Los mecanismos moleculares regulados por el receptor p75 involucran activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y NF- κ B respectivamente, los que también pueden fomentar activación transcripcional dentro de la célula (Reichardt 2006, Kraemer et al. 2014, Meeker and Williams 2014).

La contribución de las neurotrofinas junto a sus receptores ha sido mayormente descrita en estados inmaduros del cerebro por su participación en el crecimiento

neurítico y plasticidad sináptica (A. Kimberley McAllister, 2001). Sin embargo, evidencia creciente muestra que esta vía regula diversos procesos durante la etapa adulta y envejecimiento tanto en sinapsis centrales como periféricas (Pérez et al., 2019; Meeker and Williams 2014). Junto a que desempeña un papel relevante en la regulación del dolor crónico (Pezet, 2014).

Así, las neurotrofinas se posicionan como actores moleculares relevantes en la comprensión de la neurobiología de esta enfermedad.

3.5 Neurotrofinas en dolor crónico y dolor neuropático

La vía de señalización de las neurotrofinas ha sido activamente involucrada en los mecanismos neurofisiológicos del dolor. Particularmente, NGF incrementa su expresión en estados de dolor inflamatorio sensibilizando los sistemas nociceptivos, lo que desencadena hiperalgesia mecánica (McMahon, 1996). Esto ocurre debido al incremento de su expresión en la zona de injuria, para luego ser transportado retrógradamente junto a su receptor TrkA a través de los axones de las neuronas sensoriales hacia el soma en los GRD (Denk et al., 2017).

En esta zona NGF induce un incremento en la expresión del ligando BDNF, que liberarán estas mismas neuronas en la médula espinal, favoreciendo su excitabilidad (Pezet, 2014).

Numerosos estudios en modelos animales han validado la contribución de NGF y BDNF en dolor crónico inflamatorio (Obata & Noguchi, 2006; McMahon, 1996), ya sea a través del análisis mismo estas proteínas en modelos *in vivo*, o a través del uso de moléculas secuestrantes, demostrando así, que la reducción de estas neurotrofinas disminuye sintomatología característica del dolor crónico. (Pezet, 2014).

Por otro lado, existe menos evidencia respecto a la participación de las neurotrofinas en los mecanismos asociados a dolor crónico neuropático. Al respecto, NGF incrementa su expresión en la asta dorsal ipsilateral de la médula espinal en modelos animales CCI (Siniscalco et al., 2011), regulando la expresión de genes que codifican para proteínas cuya participación y/o activación se relacionan al incremento del dolor tales como; sustancia P, CGRP, canales de sodio, entre otros, desde los GRD hacia el SNC (Siniscalco et al., 2011).

Adicionalmente, el incremento de BDNF en médula espinal se ha relacionado con la sensibilización central, lo que se caracteriza por cambios en la transmisión sináptica que desencadena hiperexcitabilidad neuronal (Latremliere & Woolf; 2009. Esto ocurre ya que BDNF permite la fosforilación y potenciación de los receptores NMDA postsinápticos en neuronas espinales, contribuyendo al desarrollo del DN en etapas tempranas y en el mantenimiento de esta patología a través del tiempo (Geng et al., 2010).

Por otro lado, los receptores de neurotrofinas de alta afinidad; Trks, también incrementan su expresión en DN, al mismo tiempo que los hacen sus ligandos. Así se observa en GRD y en médula espinal en modelos murinos de ligadura del nervio espinal (SNL), activando la vía ERK 1/2, relacionada con el desarrollo de sintomatología característica del dolor neuropático como lo es la hiperalgesia (Khan & Smith, 2015; Pezet et al., 2002).

Aún cuando se ha descrito la participación de la señalización de neurotrofinas junto a sus receptores de alta afinidad Trks en los mecanismos de dolor crónico, poco se sabe de la participación del receptor p75 dentro de esta patología, a pesar de tener la capacidad de unirse con todas las neurotrofinas incluidas sus proformas.

3.6 Receptor de neurotrofina p75

El receptor p75 pertenece a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral (TNF). Posee un dominio extracelular que incluye cuatro motivos ricos en cisteínas, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (He and Garcia 2004, Chen et al. 2009). Se expresa ampliamente en el sistema nervioso en etapas del desarrollo, sobre todo en procesos de sinaptogénesis (proceso mediante el cual las neuronas forman conexiones durante el desarrollo del cerebro) y/o muerte celular que también ocurre con mayor frecuencia en esta etapa (Lee et al., 1994).

Este receptor tiene la capacidad de activar diversas vías de señalización mediadas por JNK y NF-KB, las cuales desencadenan respuestas que van desde apoptosis hasta la supervivencia celular (Anders Nykjær & Willnow, 2012). Esto ocurre debido a que p75 puede ser activado por la unión de dímeros de neurotrofinas, induciendo la dimerización del receptor a través de puentes disulfuro. (Kraemer et al. 2014). A su vez, puede coseñalar con al menos tres clases diferentes de receptores que median distintas respuestas. Por un lado, se comporta como correceptor formando complejos heterodiméricos con miembros de la familia Trk, generando un aumento en la afinidad de las neurotrofinas por dicho receptor aproximadamente 100 veces (Meeker & Williams, 2014). Por otra parte, puede unirse a la proteína de membrana Sortilina, lo que proporciona mayor afinidad por la unión de Pro-NT, permitiendo señalizaciones intracelulares generalmente opuestas a las de neurotrofinas. Por último, su conjugación con receptores Nogo y Lingo-1, permite la unión de proteínas asociadas a mielina, las cuales inhiben el alargamiento axónico (Ibáñez & Simi, 2012; Lewin & Nykjaer, 2014; Dechant & Barde, 2002) (Figura 4).

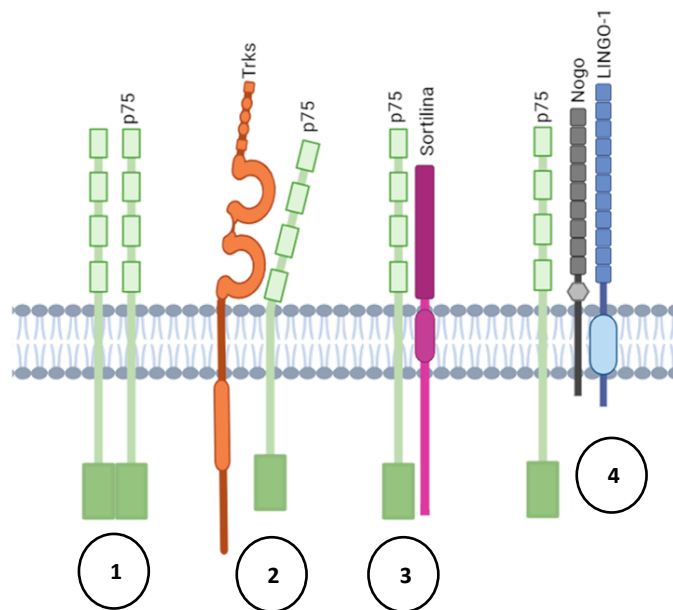


Figura 4. Esquematzación de la estructura del receptor de neurotrofina p75 y sus correceptores Trks, Sortilina, Nogo y Lingo-

1. Receptor de neurotrofinas p75 coseñaliza con distintos tipos de proteínas de membrana. P75 tiene la capacidad de dimerizar y desencadenar señalizaciones intracelulares sin necesidad de unirse a otros receptores. La unión de p75 a receptores Trks incrementa la afinidad por la unión a neurotrofinas. Por otro lado, la unión de p75 a Sortilina proporciona mayor afinidad por proneurotrofinas. Finalmente, la unión de p75 a receptores como Nogo y Lingo-1 favorece la unión a proteínas derivadas de mielina que suprimen el crecimiento axonal. (1) Receptor de neurotrofinas p75 dimerizado. (2) Receptor de

neurotrofinas p75 coseñalizando con receptores Trks. (3) Receptor de neurotrofinas p75 coseñalizando con Sortilina. (4) Receptor de neurotrofinas p75 coseñalizando con Nogo y Lingo-1. Modificado de: Meeker and Williams 2014; BioRender Templates, 2024).

El receptor de neurotrofinas p75 ha sido mayormente caracterizado en etapas del desarrollo, en diferentes células de todas las regiones cerebrales, principalmente en motoneuronas en desarrollo (Heuer et al., 1990). En adición, se ha observado que los axones periféricos de embriones de ratón *p75*^{-/-} se encuentran severamente atrofiados desde E11.5 hasta E14.5. Por otro lado, en modelos *in vitro*, la migración de células de Schwann desde los ganglios de la raíz dorsal hacia el asta dorsal se reduce significativamente en los embriones *p75*^{-/-} de estadio E12.5 (Bentley y Lee, 2000).

Pese a la caracterización del receptor durante el desarrollo, la expresión de p75 en el sistema nervioso adulto está muy disminuida en comparación con los estadios embrionarios. Son sólo algunos tipos celulares que mantienen altos niveles de este receptor, por ejemplo, neuronas simpáticas y colinérgicas (Meeker & Williams, 2014). Sin embargo, se ha observado el incremento de p75 posterior a injuria (Underwood & Coulson, 2008; Irmady et al., 2014; Volosin et al., 2008) o en enfermedades neurodegenerativas tanto en neuronas como en glía (Terry et al., 2011). De esta manera, se sugiere que este receptor podría poseer un rol activo en diferentes patologías como el dolor crónico, ya sea

permitiendo apoptosis celular para eliminar células dañadas o para incrementar la supervivencia neuronal (Obata et al., 2006; Li et al., 2023). En esta dirección, se ha reportado que el incremento de NGF en el inicio de respuestas inflamatorias aumenta la excitabilidad de neuronas sensoriales posiblemente a través de la interacción con p75 (Zhang et al., 2013). Por otro lado, ratones *p75*^{-/-} presentan un aumento en los umbrales a estímulos nocivos mecánicos analizado a través del test de Von Frey (Bergmann et al., 1997). Adicionalmente, se ha descrito que el receptor de neurotrofinas p75 controla la sensibilidad térmica, donde la ausencia de este resulta en hipoalgesia al calor, al mismo tiempo que se detectó hiperalgesia al frío (Pérez et al., 2019). Sin embargo, aunque existen reportes de la participación de p75 en la sensibilización de las fibras nociceptivas luego de una injuria y la regulación de la hiperalgesia térmica y mecánica en nocicepción, poco se sabe del cómo este receptor podría estar involucrado en mecanismos moleculares que desarrollan el dolor agudo y lo transforman a dolor crónico.

3.7 P75 en dolor crónico y dolor neuropático

Las lesiones en el sistema nervioso adulto a menudo dan como resultado la reactivación de las vías de señalización que normalmente sólo están activas durante el desarrollo (Ibáñez & Simi, 2012). El receptor de neurotrofinas p75 es una de esas moléculas que incrementa su expresión en el sistema nervioso en condiciones patológicas (Kraemer et al. 2014; Ibáñez & Simi, 2012). En esa

dirección, recientemente se ha descrito el aumento de p75 en médula espinal en modelo de dolor inflamatorio en ratas, donde la señalización espinal proBDNF/p75 participa en la regulación de la neuroinflamación a través de las vías p-ERK/NF- κ B, específicamente en neuronas sensitivas (Li et al., 2023). Adicionalmente, el bloqueo de p75 a través de p75NTR-ECD-Fc (anticuerpo anti-dominio extracelular de p75), suprime las respuestas inflamatorias mediante la inhibición de las vías p-ERK y p-65 en este tipo de dolor crónico (Li et al., 2023). Por otro lado, en ratones knockout para el gen de p75, se observó que el número de axones mielinizados y el grosor de la vaina de mielina de los nervios ciáticos lesionados se redujeron significativamente al compararlos con ratones wildtype; indicando la importante participación de p75 en la mielogénesis durante la regeneración de los nervios periféricos tras una lesión en esta zona (Song et al., 2005).

En modelos de DN, p75 incrementa su expresión en neuronas y astrocitos en GRD en modelos animales de DN mediante el aplastamiento del nervio ciático o su ligación, lo que se ha relacionado directamente con alodinia mecánica (Fukui et al., 2009; Obata et al., 2006). Junto a eso, la inhibición de la acción de p75 mediante LM11A-31, molécula no peptídica que inhibe la unión de neurotrofinas al receptor, disminuye el comportamiento doloroso, provocando un decrecimiento en la hipersensibilidad mecánica y favoreciendo la recuperación funcional de algunas células gliales de la médula espinal (Tep et al., 2013). Sin embargo, es

limitado el conocimiento que involucra la participación, expresión y contribución de este receptor en el desarrollo y mantención del dolor neuropático. Más aún, poco se conoce respecto a la contribución de la señalización mediada por p75 en la médula espinal en la neurofisiología del DN, por lo que resulta relevante analizar la expresión de este.

4 PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Aunque distintos datos sugieren la importante participación del receptor p75 en diferentes tipos de dolor crónico, la evidencia en modelos de dolor neuropático sigue siendo acotada. Se ha observado un incremento de p75 en neuronas y glía en GRD en modelos murinos que semejan la patología. Sin embargo, poco se sabe respecto al rol del receptor de neurotrofinas p75 y su variación en la expresión en médula espinal durante el DN. En su conjunto, esta tesis aborda la pregunta: ¿Cómo varía la expresión del receptor de neurotrofinas p75 en la médula espinal en un modelo murino de dolor neuropático?

5 HIPÓTESIS

El receptor de neurotrofinas p75 incrementa su expresión en médula espinal en modelo murino de dolor neuropático.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general: Caracterizar la expresión del receptor de neurotrofinas p75 en médula espinal en modelo murino de dolor neuropático.

6.2 Objetivos específicos:

- 1. Evaluar la expresión del receptor de neurotrofinas p75 en médula espinal en modelo murino de dolor neuropático.**
- 2. Evaluar la expresión subcelular del receptor de neurotrofina p75 en distintos tipos celulares de médula espinal en modelo murino de dolor neuropático.**

7 MATERIALES

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 30 ratones macho C57/BL6 wildtype (WT) de 2-4 meses de edad. Los animales se mantuvieron en cajas en grupos de 2 a 6, en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Los métodos implementados para el cuidado y manipulación del modelo de ratón C57/BL6 lo desarrolló personal altamente calificado conjuntamente a la médico veterinario, siguiendo las recomendaciones de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) publicadas el año 2023, en el texto “Lineamientos bioéticos para la investigación en animales”, junto al comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción. Los ratones utilizados en esta tesis se mantuvieron y obtuvieron del bioterio del departamento de Fisiología de la Universidad de Concepción.

7.2 Anticuerpos

En la dilución indicada del propósito experimental, como se muestra en la tabla 1 y 2, se usaron anticuerpos primarios y secundarios.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en los diferentes experimentos.

Se utilizó la dilución indicada para las distintas técnicas. IHQ: inmunohistoquímica; WB: Western Blot.

Antígeno	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
P75	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB; IHQ	1:1000 1:500
BDNF	Policlonal	Conejo	Thermo Fisher	WB	1:1000
TrkA	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
TrkB	Monoclonal	Ratón	Cell Signaling	WB	1:1000
p-TrkB	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	IHQ	1:300
p-ERK	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
JNK	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
p-JNK	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
Actina	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
NeuN	Monoclonal	Ratón	Thermo Fisher	IHQ	1:300
MAP2	Monoclonal	Cobaya	Cell Signaling	IHQ	1:300
GFAP	Monoclonal	Ratón	Thermo Fisher	IHQ	1:300
Iba1	Monoclonal	Mouse	Wako	IHQ	1:300
DAPI			Thermo Fisher	IHQ	1:100

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados.

Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados en la dilución indicada respecto a las distintas técnicas: IHQ: inmunohistoquímica; WB: Western Blot.

Fluoróforo	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
IgG HRP	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling	WB	1:5000
IgG HRP	Monoclonal	Ratón	Cell Signaling	WB	1:5000
Cy2	Policlonal	Conejo Ratón Cobaya	Santa Cruz	IHQ	1:300
Cy3	Policlonal	Conejo Ratón	Santa Cruz	IHQ	1:300
Cy5	Policlonal	Conejo Ratón	Santa Cruz	IHQ	1:300

7.3 Secuencia de partidores de neurotrofinas y sus receptores.

Se recopilaron las secuencias de los partidores para los genes de los receptores de neurotrofinas *p75*, *TrkA* y *TrkB* junto a sus neurotrofinas *NGF* y *BDNF* desde publicaciones previas (Tabla 3). La validez de estos partidores fue confirmada a través de una qPCR en muestras de médula espinal en modelo animal CCI y SHAM. Luego se realizó un gel de agarosa al 2% con fines de poder visualizar cualquier subproducto de la reacción, hibridación de los propios partidores o productos no deseados en la reacción por contaminación verificando los pesos moleculares de los amplicones disponibles en la literatura previamente.

Tabla 3. Partidores utilizados en qPCR.

Gen	Secuencia	Amplicón	Especie	Tm	Bibliografía
BDNF	FWD: TTACTCTCCTGGGTTCTGA REV: ACGTCCACTTCTGTTTCCTT	94 pb	Mouse	FWD: 54,7 °C REV: 54,0 °C	(Wei et al., 2022)
NGF	FWD: GGGGGAGTTCTCAGTGTGTG REV: TGACGAAGGTGTGAGTCGTG	236 pb	Mouse	FWD: 57,6 °C REV: 57,0 °C	(Li et al., 2021)
P75	FWD: CTGCTGCTTCTAGGGGTGTC REV: ACACAGGGAGCGGACATACT	248 pb	Mouse	FWD: 59,1 °C REV: 59,4 °C	(Nicklela Delivanoglou et al., 2020)
TrkA	FWD: TCCTTCTCGCCAGTGGACGGT AA REV: AGTGCCTTGACAGCCACGAGC AT	458 pb	Mouse	FWD: 62,0 °C REV: 63,4 °C	(Girard et al., 2011)
TrkB	FWD: TGACGCAGTCGCAGATGCTG REV: TTTCCTGTACATGATGCTCTCT GG	245 pb	Mouse	FWD: 60,4 °C REV: 56,5 °C	(Girard et al., 2011)

7.4 Reactivos y soluciones en general

Etanol (Merck); HCl (Merck); isopentano (Merck); isopropanol (Merck); Glicina (US Biological); Tween 20 (US Biological); BSA (Rockland); medio de montaje acuoso para fluorescencia (DakoCytomation), medio para montaje histológico Entellan (Merck); Paraformaldehído (Sigma); Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4); Solución de Stripping (glicina 0,2 M, SDS 0,1%p/v, Tween-20 1% v/v, pH 2,2); Buffer electroforesis para proteínas (15mM Tris-HCl, 960mM glicina, 0,5% p/v SDS, pH 8,3); Buffer gel separador o Lower Buffer (1,5M Tris-HCl, pH 8,8, SDS 0,4 %p/v); Buffer gel concentrador o Upper Buffer (500mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS 0,4 %p/v); Buffer de Transferencia (0.25M Tris-HCl, 1,02 M glicina, pH 8,3); Buffer de carga para proteínas 4X (250mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% v/v Glicerol, 8%p/v SDS, 0,04 % p/v Bromofenol, 2% v/v betamercaptoetanol); acrilamida 30% (29% p/v acrilamida, 1% p/v bisacrilamida, Biorad); Polisulfato de amonio o APS (10% p/v); TBS/Tween 20 (20,7 mM de Tris; 72,3 mM de NaCl, 0,1% v/v Tween-20). Buffer RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40 ,1% sodium deoxycholate 0.1% SDS) (Thermo Fisher), inhibidor de proteasa (Thermo Fisher) y ortovanadato (Sigma-Aldrich®).

7.5 Kits comerciales

Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer): Reactivo que revela en un sólo paso, a través de quimioluminiscencia, la actividad peroxidasa de rábano (HRP) conjugada a anticuerpos secundarios en ensayos de Western Blot.

iScript™ Reverse Transcription Supermix (BIO-RAD): Kit de síntesis de ADNc para el análisis de la expresión génica mediante qPCR en tiempo real. El kit contiene todos los componentes necesarios, excepto la plantilla de ARN para la transcripción inversa.

Kit “Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA): Kit que incluye los componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación en una única reacción de PCR en tiempo real.

7.6 Materiales en general y equipos disponibles

Cubreobjetos discoidales de vidrio de 12 mm de diámetro (Deckglaser), cubreobjetos rectangulares 24X50 mm (Citoglas), portaobjetos (Citoplus), Kit de filamentos Von FREY (BIOSEB); Equipo IITC Electronic Von Frey (San Diego Instruments, Inc), Li-Cor Imaging system (LI-COR, Biosciences), termociclador MultiGene Optimax- LABNET-LABNET INTERNATIONAL INC, equipo Mx3000P QPCR System (AGILENT TECHNOLOGIES), material de disección (FST) y membrana de PVDF (0,45 µm, 26,5cm x 3,75m Thermo Scientific™).

Por otra parte, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción cuenta con el Centro de Microscopía Avanzada CMA-Biobío, el cual posee un microscopio de súper resolución LSM Elyra (Zeiss), un microscopio confocal LSM700 (Zeiss), un microscopio espectral LSM 780 (Zeiss), un microscopio SP8 LIGHTNING (Leica) y un Criostato Thermo Scientific Microm HM 525, los cuales se utilizaron para la obtención de imágenes y de cortes de tejido respectivamente.

8 MÉTODOS

8.1 Modelo de dolor neuropático

Para realizar el modelo de lesión con constricción crónica (CCI), los ratones fueron anestesiados con Isoflurano USP (Baxter) al 2,5%, seguido de un 1,8% de oxígeno equipo de anestesia (ECO- ORBI). Se afeitó y limpió la cara dorsal del muslo izquierdo con rasuradora y etanol al 70%. Utilizando instrumental aséptico, se higienizó la zona con povidona yodada y se realizó una incisión de no más de 5mm en la extremidad inferior izquierda. Luego, se aisló cuidadosamente el nervio ciático mediante la utilización de pinzas (Pinza Splinter, Megamed Chile Ltda © 2023). El nervio fue comprimido sin ejercer presión en 3 diferentes segmentos con suturas de seda negra no absorbible 5-0 mediante un nudo simple (TAGUM©, Perú). Acto seguido, se suturó la herida e inyectó de forma subcutánea suero fisiológico (200ul) para evitar la deshidratación de los ratones. Posteriormente, se esperó la recuperación de la anestesia de los animales en jaulas calefaccionadas con luz (Bennett & Xie, 1988; Gopalsamy et al., 2019; De Vry et al., 2004)

8.2 Test de Von Frey

La medición de hipersensibilidad a estímulos mecánicos se realizó utilizando un filamento de Von Frey calibrado n#7 (de 90g). Los ratones fueron posicionados en cajas de vidrio (23x18x14 cm) sobre un piso de rendija con un tamaño de tamiz de 0,8 cm de diámetro. Luego de la aclimatación y el cese del comportamiento exploratorio de los animales se midió la sensibilidad de la extremidad posterior ipsilateral (con lesión en el nervio ciático) y de la extremidad contralateral control. Alternadamente se colocó perpendicularmente el filamento y se presionó contra la planta de la pata hasta que el ratón retire la extremidad. Se midió la fuerza máxima de la presión del filamento sobre la planta de la extremidad inferior previo al retiro de la extremidad del animal mediante el equipo IITC Electronic von Frey (San Diego Instruments, Inc). Se realizaron al menos cuatros mediciones por ratón en todos los puntos. El promedio de las 4 mediciones fue considerado el valor del día. Las mediciones se realizaron un día antes de la cirugía, para evaluar las condiciones de sensibilidad mecánica basal de los ratones y al 3er y 7mo día después de la generación del modelo de dolor (Deuis et al., 2017)

8.3 Western Blot

8.3.1 Extractos de proteínas totales en médula espinal.

Se extrajeron las proteínas totales desde la zona lumbar de la médula espinal (L3-L5) de ratones modelo CCI y ratones SHAM (control). Las proteínas fueron extraídas en una solución de RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40 ,1% sodium deoxycholate 0.1% SDS) junto a una mezcla de inhibidores de proteasa e inhibidor de fosfatasa ortovanadato (Thermo Fisher). El extracto fue disgregado mecánicamente con el uso de pipetas y posteriormente sonificado mediante 5 ciclos de 1 minuto con 1 minuto de descanso entre ciclos en hielo. Posteriormente, los tejidos fueron centrifugados a 13.000 RPM por 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido correspondió al extracto de proteínas totales y fue almacenado a -20°C hasta su uso (Li et al., 2023).

8.3.2 Extractos de proteínas totales de la zona dorsal de la médula espinal.

Se extrajeron las proteínas totales desde la zona lumbar de ratones modelo CCI y ratones SHAM (control) (L3-L5), separando la zona dorsal de la zona ventral, con el fin acotar el sector donde conectan las neuronas sensoriales con la médula espinal (Geng et al., 2010). Las proteínas de la zona del asta dorsal fueron extraídas en una solución de RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40 ,1% sodium deoxycholate 0.1% SDS) junto a una mezcla de inhibidores

de proteasa y fosfatasa ortovanadato (Thermo Fisher). El extracto homogeneizado y tratado para la obtención de proteínas totales según lo explicado en la sección 6.3.1.

8.3.3 Cuantificación de proteínas.

Para determinar la concentración de cada extracto total de proteínas se cuantificó por espectrofotometría (infinite 200 NanoQuant, Tecan). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 310nm. La concentración de las muestras se determinó interpolando en la curva de calibración (Merck Chile, 2016)

8.3.4 Electroforesis de proteínas.

Para la separación de proteínas de cada una de las muestras, se cargó entre 20-25 µm de proteínas totales por muestra analizada que fueron diluidas en tampón de carga (250mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% v/v Glicerol, 8%p/v SDS, 0,04 % p/v Bromofenol, 2% v/v betamercaptoetanol) en proporción 3:1 y denaturadas a 95 °C por 5 min. Estas muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), compuesto por un gel separador de proteínas en la parte inferior (acrilamida 30% p/v, 375mM Tris-Base, pH8.8, 0,1% p/v SDS; 0,1%p/v persulfato de amonio y 0,04%v/v TEMED) y en la parte superior un gel concentrador (acrilamida 30% p/v, 125mM Tris-Base, pH6.8, 0,1% p/v SDS; 0,125 % p/v persulfato de amonio y 0,125 %v/v TEMED). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con Buffer de corrida o Running Buffer (15mM Tris-HCl, 960mM

glicina, 0,5% p/v SDS, pH 8,3) aplicando un voltaje constante de 100 V por 1,5-2 horas (Merck Chile, 2016; Li et al., 2023)

8.3.5 Transferencia a membrana de PVDF.

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Thermo Fisher). Para ello, se acondicionó la membrana en metanol 100% a temperatura ambiente por 2 min y luego en Buffer de transferencia (0.25M Tris-HCl, 1,02 M glicina, pH 8,3). Para la transferencia se superpuso el gel sobre la membrana, ambos entre 4 papeles filtro y dos esponjas, los que fueron fijados con una abrazadera y se introdujeron dentro de una cámara con buffer de transferencia (0.25M Tris-HCl, 1,02 M glicina, pH 8,3). Para generar el traspaso de las proteínas desde el gel a la membrana, se aplicó una corriente eléctrica constante de 350 mA por 1,5 h.

8.3.6 Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado

La membrana de PVDF fue bloqueada con tampón Tris-base/TBS-tween20 (20,7 mM de Tris; 72,3 mM de NaCl, 0,1% v/v Tween-20) y 5% p/v de leche descremada por 1 h en agitación a temperatura ambiente y posteriormente fue incubada con anticuerpo primario (Tabla N°1) diluido en solución de bloqueo (TBS/Tween20-BSA3% p/v) por toda la noche a 4°C. Después de lavar 5 veces durante 8 min

con tampón TBS/Tween20, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (Tabla N° 2) diluido en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. La actividad de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada al anticuerpo secundario fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial “Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer)” y sus imágenes adquiridas a través del equipo Li-Cor Imaging system (LI-COR, Biosciences). En algunos casos la membrana fue lavada e incubada en solución de stripping (glicina 0,2 M, SDS 0,1%p/v, Tween-20 1% v/v, pH 2.2) dos veces por 10 min a T° ambiente, luego lavado con PBS 1X dos veces por 10 min, 2 veces con TBS-tween20 por 5 min, para la inmunodetección con un anticuerpo diferente.

8.3.7 Cuantificación de la intensidad de las bandas

Para cuantificar los niveles de expresión de las proteínas de interés, la intensidad de cada banda fue medida utilizando el software ImageJ. Se seleccionaron las zonas que contenían las bandas usando el comando “select first lane” y se cuantificó el área bajo las curvas de los máximos de intensidad usando los comandos “plot lanes” y “wand tool”. Los valores fueron expresados como la relación entre la intensidad de banda de la proteína con su control de carga que en este caso correspondió a la proteína actina.

8.4 PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)

8.4.1 Extractos de médula espinal

Para la extracción de tejido medular, ratones de cada grupo correspondiente a los modelos de dolor neuropático (CCI) y sus respectivos controles (SHAM), fueron sedados en una cámara con 1 ml de Isoflurano por 3 min. Luego se midieron respuestas a estímulos y se corroboró el estado de sedación completa. Posteriormente se realizó un procedimiento de decapitación para dar paso al procedimiento quirúrgico de extracción medular. Se trabajó bajo lupa y se extrajo la zona lumbar (L3-L5), la cual se trasladó a una solución de extracción (PBS 1x, pH 7.30) a 4°C. Finalmente las muestras de tejido nervioso fueron depositadas en tubos eppendorf de 1.5 ml con 0,5 ml de reactivo TRIzol™ Reagent e inmediatamente procesados para su extracción de ARN (Wu et al., 2005)

8.4.2 Extracción de ARN total de médula espinal.

Tejidos en trizol se les agregó 600 µl de Cloroformo (MERCK) para aislar el ARN total de la fase orgánica, se sometió a vortex y se incubó a 4°C por 3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente se extrajo la fase acuosa (aproximadamente 80% del volumen total de TRIzol utilizado), se precipitó el ARN total con 500 µl de Isopropanol (MERCK) y se incubó a 4°C por 10 min. Luego se centrifugaron las muestras a 12.000 g por 10 min a 4°C. Se removió la totalidad del sobrenadante observando un pellet de

color blanco de ARN en el fondo del tubo. Se lavó el pellet con 1 ml de Etanol 80% (MERCK), se agitó y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C. Luego, se secó el pellet boca abajo sobre papel absorbente de arroz por 5 a 10 min y se resuspendió en 100 µl agua libre de nucleasas. Para hidratar y disolver el pellet y se incubó a 62°C por 5 min. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso (Wu et al., 2005)

8.4.3 Cuantificación de ARN total.

Para cuantificar la concentración de ARN total extraído se utilizó espectrofotometría (infinite 200 NanoQuant, Tecan). El equipo utilizado entregó datos de concentración en ng/µl, además de la pureza (proporción 260/280), usando valores cercanos a 1.8, lo necesario para seguir con experimentos. Para verificar la integridad y calidad del extracto se realizó geles de agarosa al 2% para visualizar bandas de ARN (Wu et al., 2005).

8.4.4 Obtención de ADNc a partir de ARN total por RT-PCR

Se realizó la retrotranscripción de ARN total obtenido de las muestras, utilizando kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit- AGILENT TECHNOLOGIES bajo el siguiente protocolo: 1µl affinity script (a), 3 µl oligo DT (b), 10 µl Master Mix (c), X µl muestra de ARN total (d), Y µl de H₂O RNAsa Free (e).

Para obtener la cantidad de ARN total a tomar para la utilización del kit, se realizó el siguiente cálculo:

$$X \mu\text{l ARN total} = 2000 \text{ ng Finales de ADNc} / [\text{ARN total}] \text{ ng} / \mu\text{l}.$$

Para obtener el volumen de H₂O de RNAasa Free, se utilizó la siguiente regla:

$$Y \mu\text{l de H}_2\text{O RNAasa Free} = \text{Volumen Final } 20 \mu\text{l} - \Sigma [(a) + (b) + (c) + (d)] \mu\text{l}.$$

Finalmente, el proceso de la obtención de ADNc a partir de ARN total se realizó en el termociclador MultiGene Optimax- LABNET-LABNET INTERNATIONAL INC, bajo los parámetros correspondiente (. 5 min a 25°C; 45 min a 42°C; 5 min a 95°C; 10 min a 4°C). Las muestras de ADNc obtenidas fueron rotuladas y almacenadas a -20°C (Wu et al., 2005).

8.4.5 Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)

Para realizar la cuantificación de las muestras se utilizó el kit “kit Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix”. Se realizó el mix de reacción siguiendo el siguiente protocolo: 12 µl de Master Mix SYBR® Green; 9,45 µl de H₂O RNAasa Free; 0,05 µl de ROX (fluoróforo de referencia); 1 µl de ADNc; 1 µl de Primer Forward (Tabla 3); 1 µl de Primer Reverse (Tabla 3). La cuantificación se realizó en el equipo Mx3000P QPCR System (AGILENT TECHNOLOGIES), donde se aplicó el seteo correspondiente: 1 ciclo de 95°C; 40 ciclos de 95-55°C; 1 ciclo de 95°C-55°C-95°C. Se revisaron las curvas de amplificación, curvas de disociación

y valores de Ct (Cycle threshold) obtenidos por el equipo. Los datos de Ct fueron analizados mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando la siguiente fórmula: $R = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control}]}$; $R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Al final se realizó un gel de agarosa al 2% para visualizar cualquier subproducto de la reacción, hibridación de los propios partidores o productos no deseados en la reacción por contaminación. Para eso se verificaron los pesos moleculares de los amplicones disponibles en la literatura previamente (Tabla 3) (Livak & Schmittgen, 2001)

8.5 Inmunohistoquímica

8.5.1 Obtención de las muestras

Para la obtención de muestra medular de ratones modelo neuropático CCI y su respectivo control SHAM, fue necesaria la perfusión de los animales con paraformaldeído (PFA) al 4% p/v disuelto en PBS 1X (pH 7,3), con el fin de poder fijar el tejido. Posteriormente, se realizó la disección medular de la zona lumbar (L3-L5) y en un tubo eppendorf de 1,5 mL se sumergió la muestra en PFA 4% p/v -PBS 1X por 24h a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se deshidrataron las muestras en una solución de sacarosa al 30% (p/v) durante 24h a 4°C. Luego, se incluyeron las muestras en OCT para la realización de tacos y se dejaron secar a -20°C por 24h. Se realizaron criosecciones transversales de médula espinal de 30µm de ancho en el Criostato Thermo Scientific Microm HM 525 ubicado en el Centro de

Microscopía Avanzada CMA-Biobío. Los cortes se recibieron en portaobjetos con carga positiva (SuperFrost plus). Las muestras se guardaron en una caja a -80°C.

8.5.2 Inmunohistoquímica de médula espinal

Las crio secciones montadas en los portaobjetos fueron lavadas con PBS 1X 3 veces durante 5 minutos para retirar el exceso de OCT. Luego se permeabilizaron y bloquearon (Suero equino 5 % (v/v), BSA 1 mg/mL en PBS 1X- Tritón X-100 0.3 % (v/v)) durante 1 hora 30 min a temperatura ambiente. Se hicieron 2 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X para retirar el exceso de la solución de bloqueo y se incubaron los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 1) utilizando una solución de BSA 5% + Triton 0,3% en PBS 1X durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, las crio secciones fueron lavadas 3 veces por 10min cada uno con PBS 1X para luego ser incubadas con los anticuerpos secundarios dirigidos contra IgG de ratón o conejo, unidos a sus respectivos fluoróforos Cy2 y Cy3 respectivamente (Tabla 2). La incubación se realizó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 2h. Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 1X y se montaron las muestras con un cubreobjeto de 24x50mm en medio de montaje para fluorescencia DAKO. Se dejó secar el medio de montaje en una caja oscura por 1-3h a temperatura y las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su análisis mediante microscopía confocal (Li et al., 2023)

8.6 Análisis y procesamiento de imágenes

8.6.1 Adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas utilizando los microscopios confocal Zeiss LSM 700 y confocal espectral Zeiss LSM 780 (CMA Biobío, Universidad de Concepción). Los objetivos de 40X (Plan-Apochromat 40x/1,3 Oil DIC M27) y 63X (Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil DIC M27) fueron utilizados para la visualización del asta dorsal de la médula espinal.

8.6.2 Procesamiento de imágenes

Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ para la cuantificación de intensidad de fluorescencia.

8.7 Análisis estadístico

En los datos que involucran microscopía confocal, el análisis estadístico fue realizado usando los programas GraphPad Prism 8 y Microsoft Excel 365. Todos los datos son presentados como valor de la media $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos entre los ratones modelo de dolor neuropático CCI y control SHAM, que consideran una variable, fueron realizados usando el test-t de Student de datos no pareados comparando sus promedios. Para los análisis estadísticos en los que fueron consideradas diversas variables, se utilizó el test 2 way-ANOVA

seguido del test de Bonferroni. Fueron considerados estadísticamente significativos para un intervalo de confianza del 95 %, diferencias con un valor p bajo 0.05. A los valores $p < 0.05$; $p < 0.01$ y $p < 0.001$ se les asignó significancias estadísticas crecientes (*, ** y *** respectivamente). La nomenclatura utilizada en las figuras describe como n al número de animales por cada condición.

9 RESULTADOS

Con el fin de evaluar la expresión del receptor de neurotrofina p75 en médula espinal durante el dolor crónico, se utilizaron ratones macho C57/BL6 wildtype para generar un modelo de dolor crónico neuropático a través de la constricción del nervio ciático (CCI) de la extremidad posterior izquierda de los ratones. Como control, se utilizaron ratones SHAM a los cuales sólo se le expuso el nervio ciático sin realizar la ligadura. Este modelo permitió la caracterización de la expresión proteica, génica y localización subcelular del receptor de neurotrofina p75.

9.1 Modelo de dolor neuropático por constricción del nervio ciático (CCI) causa hipersensibilidad mecánica.

Con el objetivo de evaluar la hipersensibilidad mecánica inducida mediante el modelo de constricción del nervio ciático (CCI), se realizó el test de von Frey en la extremidad posterior izquierda y derecha de los animales CCI y su respectivo control.

En una primera instancia se midió el umbral mecánico basal de los ratones a través del test de Von Frey un día antes (día -1) de la cirugía, presentando un promedio de umbral mecánico de $3.26 \text{ g} \pm 0.16 \text{ g}$ entre todos los animales (**figura 5A**). Los ratones fueron separados en dos grupos el día de la cirugía (día 0); aquellos que recibieron la triple constricción del nervio ciático (CCI) y aquellos que sólo se les expuso el nervio ciático (SHAM) como control. De esta forma, a

través de la utilización del animal control SHAM se excluyó la hipersensibilidad generada por la cirugía en sí.

Por otro lado, los animales fueron separados según técnica de laboratorio a utilizar en ellos, ya sea para el análisis de expresión proteica (western blot), para el análisis de ARNm (qPCR) o para analizar la localización de la expresión proteica subcelular (inmunohistoquímica).

Los resultados a hipersensibilidad mecánica del total de los animales muestran que desde el día 3 posterior a la cirugía, disminuyó significativamente el umbral mecánico en la pata trasera izquierda de los ratones CCI. Los valores descendieron desde $3.13\text{g} \pm 0.22\text{ g}$ a $2.10\text{g} \pm 0.18\text{ g}$, alcanzando $1.77\text{g} \pm 0.19\text{ g}$ de umbral mecánico al día 7 post cirugía. En contraste, los ratones SHAM registraron un valor de $3.29\text{g} \pm 0.16\text{g}$ de umbral mecánico al día 3 post cirugía, alcanzando valores de $3.23\text{g} \pm 0.15\text{ g}$. para la retirada de la pata trasera izquierda al día 7 (**figura 5A**).

Resultados similares fueron obtenidos en el grupo de ratones utilizados para el análisis de variación proteica a través de la técnica de western blot, donde al tercer día post cirugía disminuyó significativamente el umbral mecánico de la pata trasera izquierda de los animales CCI desde $3.18\text{g} \pm 0.27\text{ g}$ a $2.18\text{g} \pm 0.16\text{g}$ al compararlos con los animales control. Así también se observó el descenso del umbral mecánico al día 7 post cirugía de los animales CCI, alcanzando valores

de $1,80\text{g} \pm 0.37\text{g}$. Por el contrario, los animales SHAM mantuvieron el umbral mecánico de $3.21\text{g} \pm 0.16$ desde el día 3 hasta el día 7 post cirugía (**figura 5B**).

Por otro lado, en los ratones empleados para las técnicas de qPCR e inmunohistoquímica, se observó una disminución del umbral mecánico desde el día 3 hasta el día 7 post cirugía, sin embargo, no alcanzaron valores significativos debido a la poca cantidad de animales utilizados para abarcar esas técnicas (**figura 5B y 5C**).

Como control adicional, fue utilizada la extremidad posterior derecha de ambos animales, CCI y SHAM, donde los resultados comprueban que la hipersensibilidad generada por CCI en la extremidad izquierda no afecta significativamente la extremidad derecha con relación a los valores obtenidos en su condición basal previa a la intervención (**figura 5A, 5B, 5C y 5D**).

Por lo tanto, los datos de hipersensibilidad mecánica generado al séptimo día posterior a la cirugía de constricción del nervio ciático ratifican la correcta ejecución del modelo de dolor neuropático.

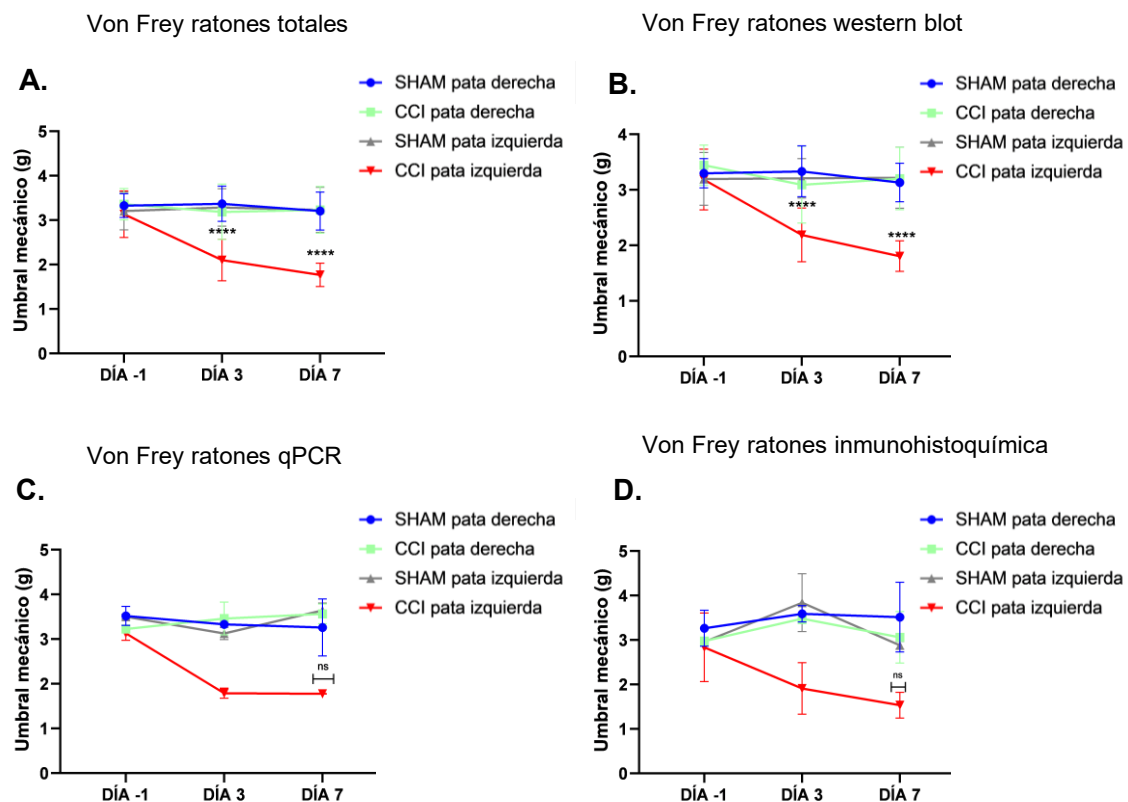


Figura 5. Incremento del umbral mecánico en la pata izquierda de los animales CCI. (A) Cuantificación de hipersensibilidad mecánica del total

de animales utilizados para experimentación, mediante el test de von Frey (n=13-15 ratones por condición utilizada). (B) Cuantificación de hipersensibilidad mecánica de animales utilizados para western blot, mediante el test de von Frey (n=10-12 ratones por condición utilizada). (C) Cuantificación de hipersensibilidad mecánica de animales utilizados para qPCR, mediante el test de von Frey (n=2 ratones por condición utilizada). (D) Cuantificación de hipersensibilidad mecánica de animales utilizados para inmunohistoquímica, a través del test de von Frey

(n=2 ratones por condición utilizada). Los resultados muestran el promedio de $\pm$ SEM desde A-D con 2-way-ANOVA de dos variables, seguido de la prueba de Bonferroni (ns: diferencias no significativas, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

9.2 Evaluación de la expresión proteica del receptor de neurotrofina p75 en médula espinal en dolor neuropático.

En consideración que p75 incrementa su expresión en médula espinal en modelos de dolor crónico inflamatorio en ratas (Li et al., 2023), junto a que su inhibición resulta en una disminución a sensibilidad térmica y mecánica (Tep et al., 2013) evaluamos si p75 varía su expresión proteica en la región lumbar de ratones CCI.

Los resultados de la inmunodetección mediante western blot en extractos de proteínas de la región lumbar total de la médula que fueron normalizados frente al control de carga β -actina, indican que existe una tendencia al aumento de p75 en la zona lumbar de la médula espinal en los animales CCI. Sin embargo, no se obtuvo diferencia significativa entre ambos grupos de animales (**figura 6A y 6B**).

Por otro lado, se evaluó la expresión proteica de la neurotrofina BDNF, relacionada directamente por su incremento en la neuromodulación del dolor (Geng et al., 2010). Los resultados no muestran valores significativos en la zona lumbar de ratones CCI de esta neurotrofina, aún cuando se observa una

tendencia al incremento de BDNF en los animales sometidos a la constricción del nervio ciático en comparación a sus controles SHAM (**figura 6C y 6D**).

Para continuar con la caracterización de las neurotrofinas, se analizó la expresión proteica de los receptores TrkA y TrkB, involucrados en el procesamiento del dolor (Ginty & Segal, 2002; Geng et al., 2010; Cao et al., 2020). Los resultados no muestran diferencias significativas entre ambos grupos de ratones para ninguno de los dos receptores bajo los parámetros experimentales utilizados (**figura 6E, 6F, 6G y 6H**)

Finalmente, para explorar respecto a las posibles vías de señalización gatilladas por p75 durante el dolor crónico neuropático, extractos de proteínas totales lumbares fueron analizados por western blot para la inmunodetección de p-ERK y JNK. Los resultados no muestran diferencia significativa de p-ERK en la médula espinal de los animales CCI en comparación con los SHAM (**figura 7A y 7B**).

Al evaluar si el dolor neuropático produce diferencias en la expresión de la proteína JNK, los resultados indican que no hay diferencias significativas entre el grupo con DN y su control SHAM (**figura 7C y 7D**).

En consideración a que no se obtuvieron valores significativos, pero si tendencia a un incremento en la expresión de p75, BDNF, TrkB y TrkA bajo las condiciones experimentales analizadas, se circunscribió la zona de la disección lumbar exclusivamente a la asta dorsal de la médula espinal, centro de procesamiento del dolor espinal, específicamente en la lámina I y II, lugar donde llegan los

axones terminales de las neuronas sensitivas (Geng et al., 2010; Tep et al., 2013). Se utilizaron extractos proteicos totales exclusivamente de la zona dorsal y se evaluó la variación proteica de p75, TrkB, TrkA, BDNF, p-ERK y p-JNK. Los resultados indican que, bajo este nuevo parámetro experimental, existe un incremento significativo de la expresión de p75 en el asta dorsal de la médula espinal de ratones con dolor crónico neuropático, en comparación a sus controles. Los ratones con DN presentan una intensidad de $0,7260 \pm 0,1291$ en comparación a $1,190 \pm 0,1291$ de los ratones SHAM (**figura 8 A y 8B**).

Por otro lado, la neurotrofina BDNF mantuvo su tendencia al incremento en su expresión en animales CCI. Sin embargo, la diferencia entre ambos grupos de animales no fue significativa ($0,1212 \pm 0,1229$) (**figura 8C y 8D**).

De forma interesante, el receptor de alta afinidad para BDNF, TrkB, incrementó su expresión significativamente en los animales CCI al compararlos con los respectivos controles ($0,9105 \pm 0,1181$ en ratones DN y $1,240 \pm 0,1181$ en ratones SHAM) (**figura 8E y 8E**). Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el receptor TrkA, donde no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones (**figura 8G y 8H**).

Finalmente, para explorar respecto a las vías de señalización gatilladas por p75 y su posible modulación en el dolor crónico neuropático, ahora solo acotada al asta dorsal de la médula espinal, extractos de proteínas totales de esta zona

fueron analizados por western blot para la inmunodetección de p-ERK y p-JNK. Los resultados muestran un incremento significativo de la vía p-ERK en el asta dorsal de los animales CCI al compararlos con su respectivo control ($0.9850 \pm 0,07711$ en ratones DN y $1,237 \pm 0,07711$ en ratones SHAM) (**figura 9A y 9B**). Se observó en el análisis de p-JNK, donde no se obtuvieron diferencias significativas al comparar ambos grupos de animales (**figura 9C y 9D**).

En su conjunto los resultados indican que, el receptor p75 incrementa su expresión en el asta dorsal de la médula espinal de los animales CCI, al igual que TrkB al comparar ambos grupos animales. Por otra parte, p-ERK, vía de señalización gatillada por la activación del receptor de neurotrofina p75 incrementó significativamente a diferencia de p-JNK que no obtuvo valores significativos en la zona del asta dorsal de la médula espinal de los animales CCI, sugiriendo la activación de esta vía de señalización en condiciones de dolor neuropático en el asta dorsal de la médula espinal.

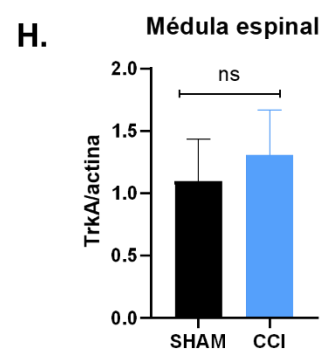
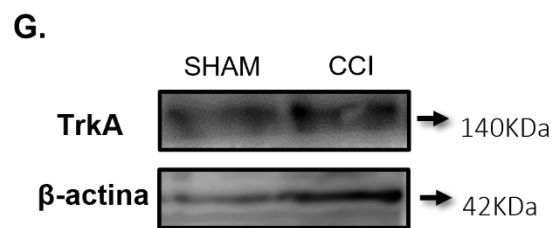
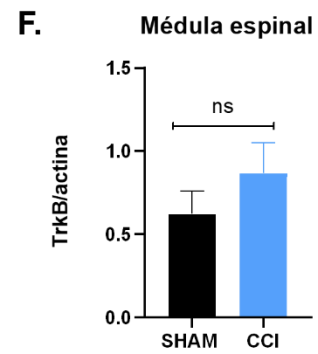
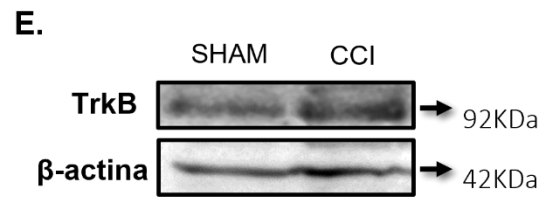
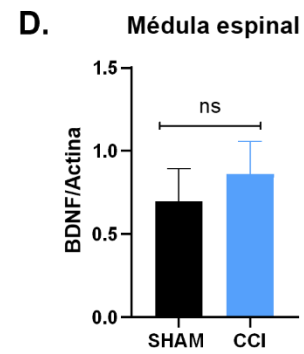
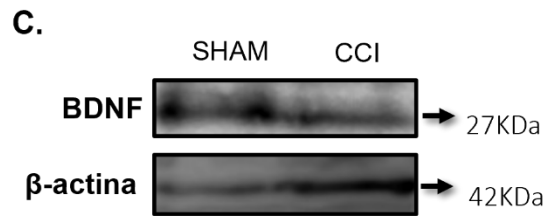
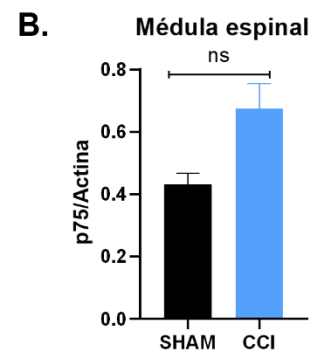
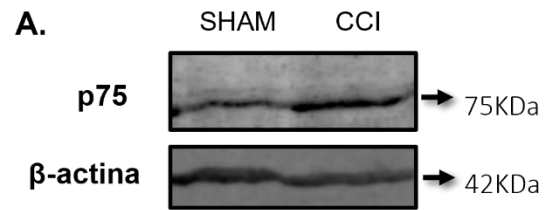


Figura 6. Variación en la expresión proteica de p75, BDNF, TrkB y TrkA en zona lumbar de médula espinal. (A) Inmunodetección por Western Blot del receptor de neurotrofina p75 en zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. (B) Inmunodetección por Western Blot de BDNF en zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. (C) Cuantificación de la intensidad de banda óptica de p75 en relación con el control de carga actina. (D) Cuantificación de la intensidad de banda óptica de BDNF en relación con el control de carga actina. (E) Inmunodetección por Western Blot de TrkB en zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. (F) Inmunodetección por Western Blot de TrkA en zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. (G) Cuantificación de la intensidad de banda óptica de TrkB en relación con el control de carga actina. (H) Cuantificación de la intensidad de banda óptica de TrkA en relación con el control de carga actina. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM. n=5 ratones fueron utilizados por condición experimental. Para el análisis estadístico se utilizó test t-student no pareado (ns: diferencias no significativas)

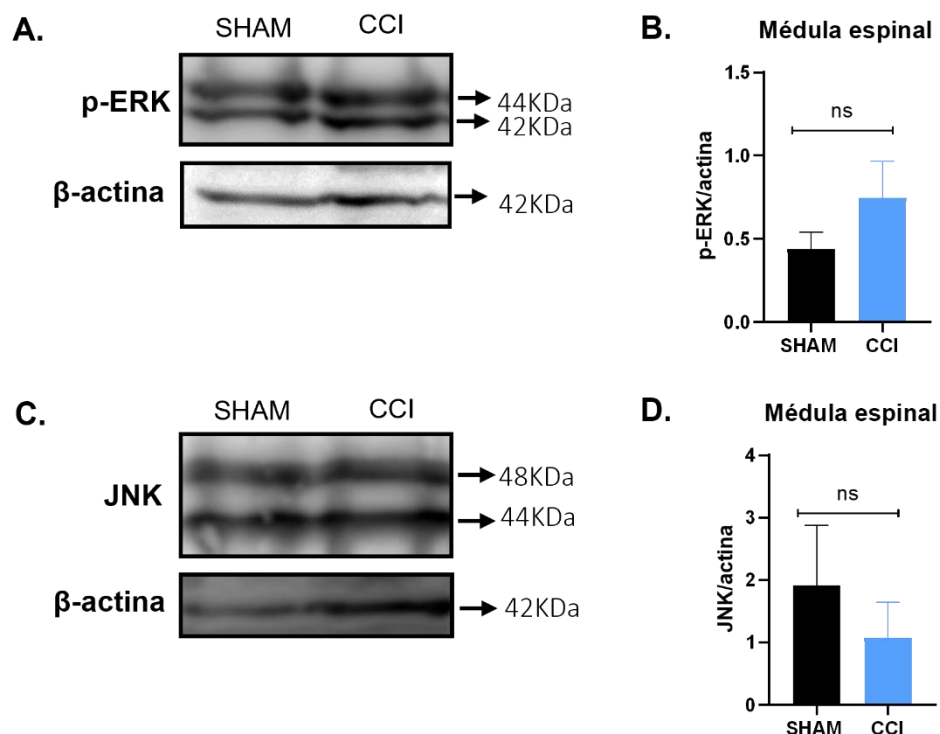


Figura 7. Variación en la expresión proteica de JNK y p-ERK en zona lumbar de médula espinal. (A) Inmunodetección por Western Blot de p-ERK en zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. (B) Cuantificación de la intensidad de banda óptica de p-ERK en relación con el control de carga β -actina. (C) Inmunodetección por Western Blot de JNK en zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. (D) Cuantificación de la intensidad de banda óptica de JNK en relación con el control de carga actina. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM. n=5 ratones fueron utilizados por condición experimental. Para el análisis estadístico se utilizó test t-student no pareado (ns: diferencias no significativas)

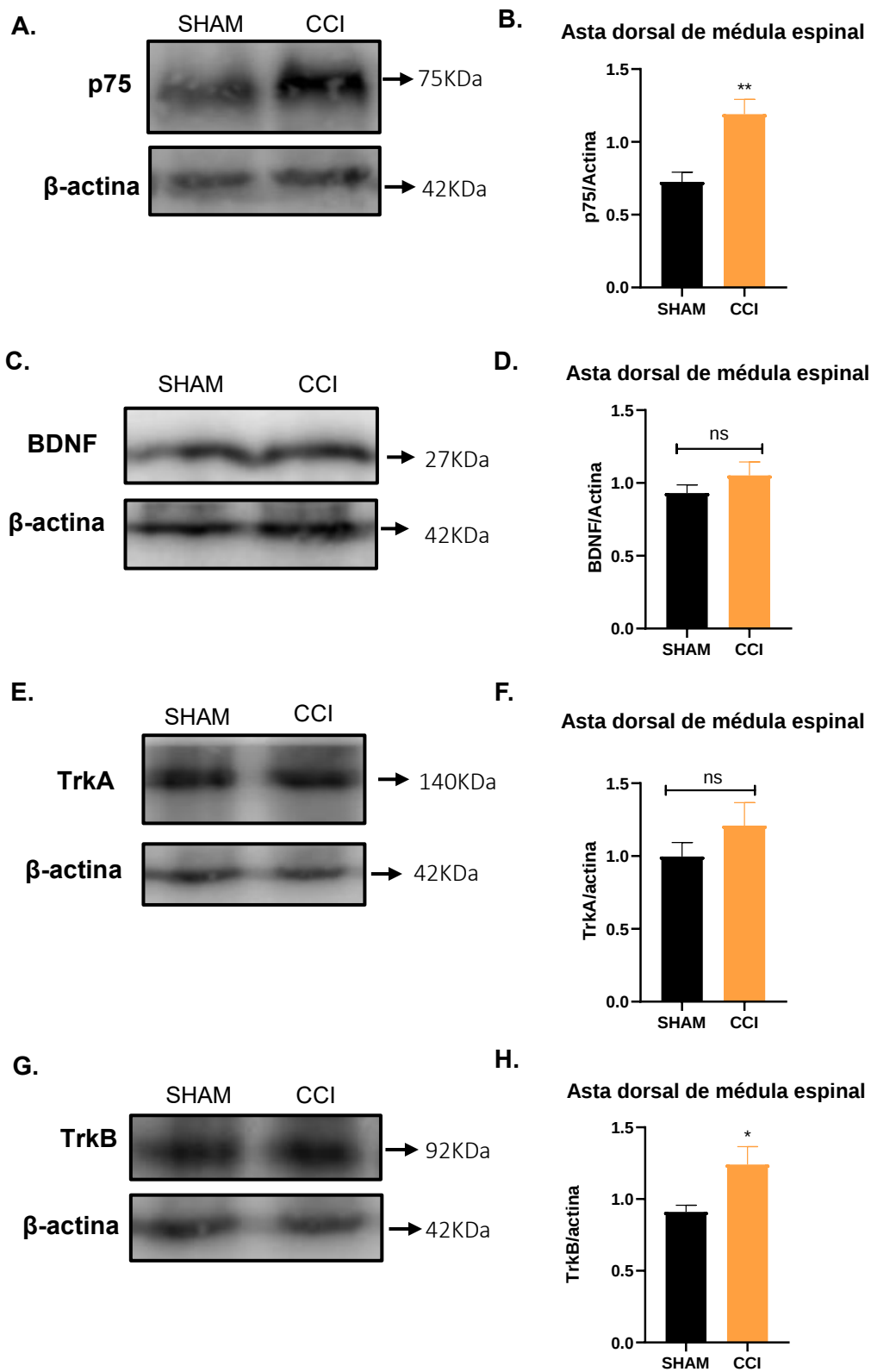


Figura 8. Variación de la expresión proteica de p75, BDNF, TrkB y

TrkA en el asta dorsal de la zona lumbar en la médula espinal. (A)

Inmunodetección por Western Blot del receptor de neurotrofina p75 en el asta dorsal de la zona lumbar (L3-L5) de la médula espinal. **(B)** Cuantificación de la

intensidad de banda óptica de p75 en relación con el control de carga β -actina.

(C) Inmunodetección por Western Blot de BDNF en el asta dorsal de la zona lumbar (L3-L5) de la médula espinal. **(D)** Cuantificación de la intensidad de banda

óptica de BDNF en relación con el control de carga β -actina. **(E)** Inmunodetección

por Western Blot de TrkA en el asta dorsal de la zona lumbar (L3-L5) de la médula espinal. **(F)** Cuantificación de la intensidad de banda óptica de TrkA en relación

con el control de carga β -actina. **(G)** Inmunodetección por Western Blot de TrkB

en el asta dorsal de la zona lumbar (L3-L5) de la médula espinal. **(H)**

Cuantificación de la intensidad de banda óptica de TrkB en relación con el control de carga β -actina. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM n=5 ratones

fueron utilizados por condición experimental. Para el análisis estadístico se utilizó test t-student no pareado (ns: diferencias no significativas, *p<0.05, **p<0.01)

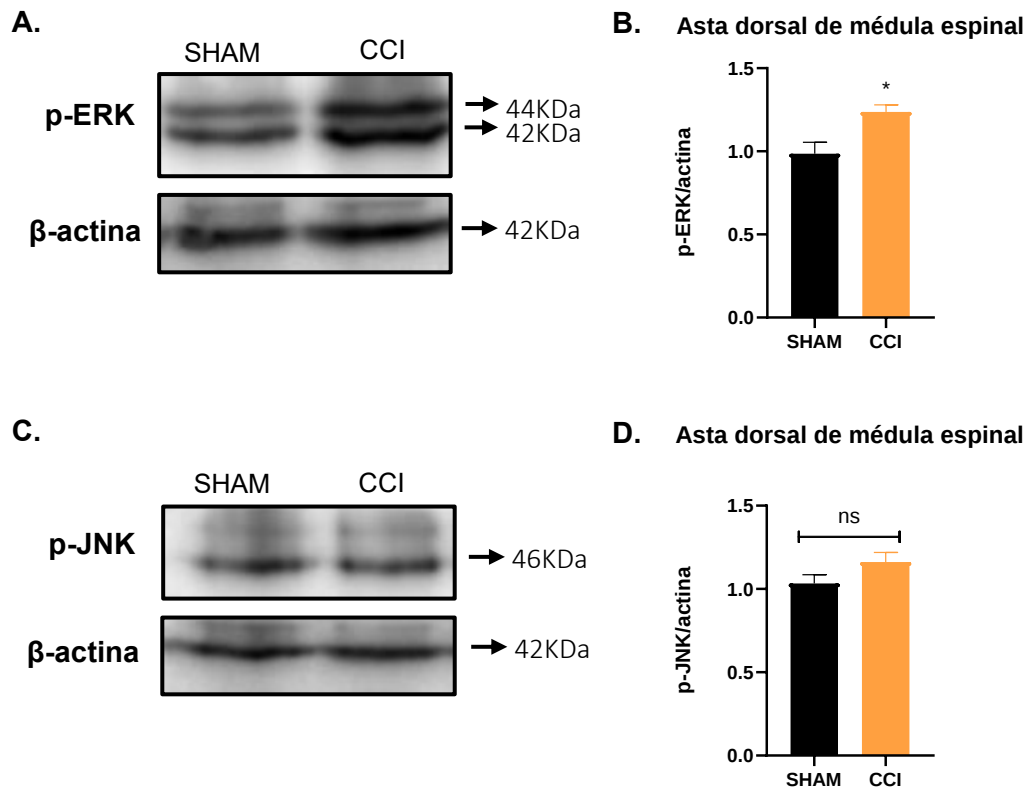


Figura 9. Variación de la expresión proteica de p-ERK y p-JNK en el asta dorsal de la zona lumbar en la médula espinal. (A)

Inmunodetección por Western Blot de p-ERK en el asta dorsal de la zona lumbar (L3-L5) de la médula espinal. **(B)** Cuantificación de la intensidad de banda óptica de p-ERK en relación con el control de carga β-actina. **(C)** Inmunodetección por Western Blot de p-JNK en el asta dorsal de la zona lumbar (L3-L5) de médula espinal. **(D)** Cuantificación de la intensidad de banda óptica de p-JNK en relación con el control de carga actina. Los resultados se expresan en promedio ± SEM

n=5 ratones fueron utilizados por condición experimental. Para el análisis estadístico se utilizó test t-student no pareado (ns: diferencias no significativas, *p<0.05)

9.3 Expresión relativa del ARNm del receptor de neurotrofina p75 en modelo murino de dolor neuropático.

Se analizó la expresión génica de *p75*, *BDNF*, *NGF*, *TrkA* y *TrkB*, a través de la cuantificación en tiempo real de ARNm. Para ellos se utilizaron extractos totales de la zona lumbar de la médula espinal de animales CCI y SHAM como control para su comparación.

Los resultados muestran extracciones representativas de ARN del modelo de dolor neuropático y su respectivo control (Tabla 4). Se observó que las concentraciones de ARN fueron suficientes y la proporción 260/280 de número cercana a 1,80, lo que caracteriza una extracción con pureza óptima.

En conjunto se realizó el análisis de la integridad del ARNm total extraído mediante un gel de agarosa, mostrando su buen estado al observar las bandas pertenecientes a las subunidades 28s y 18s de ARN ribosomal de muestras de ratones de ambas condiciones experimentales (**figura 10A**).

Para la obtención de ADNc se realizó la retrotranscripción del ARN total extraído y se utilizó para su análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Los

resultados obtenidos normalizados frente al gen “housekeeping” 18S, mostraron una tendencia al aumento de la expresión relativa del ARNm de p75 en médula espinal de los animales CCI (**figura 10B**). No obstante, no hubo diferencia significativa al compararlo con el respectivo grupo de animales control. Por otro lado, el análisis de las neurotrofinas NGF y BDNF capaces de unirse al receptor p75, no mostraron valores significativos al comparar el grupo de animales CCI v/s SHAM (**figura 10C y 10D**).

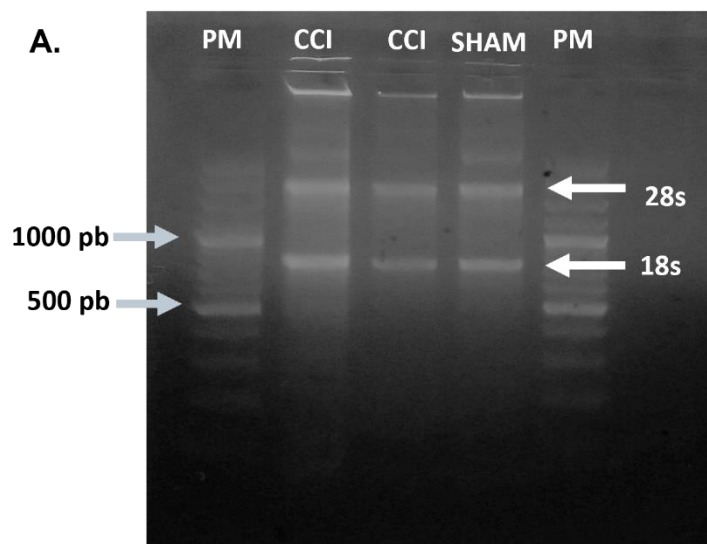
Junto a lo anterior, el análisis de la expresión relativa de TrkA y TrkB, receptores de alta afinidad para NGF y BDNF respectivamente, no se observó diferencia significativa en los resultados obtenidos entre ratones modelo DN y sus controles (**figura 10E y 10F**). Finalmente se realizó un gel de agarosa para analizar el producto final de qPCR, observando que no hubo subproductos generados de la reacción y los resultados indican los valores certeros de la expresión relativa de ARNm de cada amplicón del gen (**figura 10G**).

En conjunto, los resultados indican que no hay diferencia significativa de los genes *de p75, NGF, BDNF, TrkA y TrkB* en la zona lumbar de la médula espinal entre ratones modelo de DN y controles SHAM.

Tabla 4. Extracción ARN total zona lumbar de la médula espinal

Animal	Concentración ARN (ng/ μ l)	Ratio 260/280
CCI	565,14	1,87
CCI	537,23	1,86
SHAM	574,89	1,88

La tabla 4 muestra extracciones de ARNm representativas de los animales sometidos al modelo de dolor neuropático junto a su respectivo control. Se observan concentraciones suficientes para realizar una RT-PCR junto a que la proporción 260/280 se encuentra cercana a 1,80, lo que caracteriza una extracción con óptima pureza para trabajar.



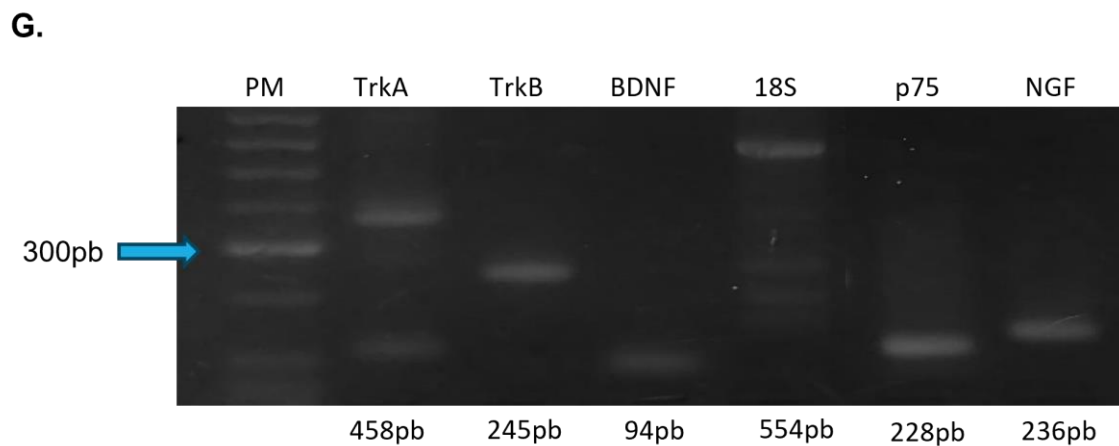
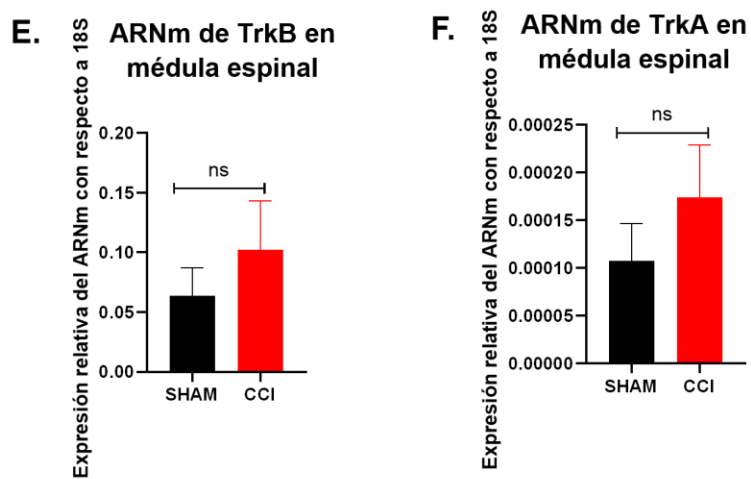
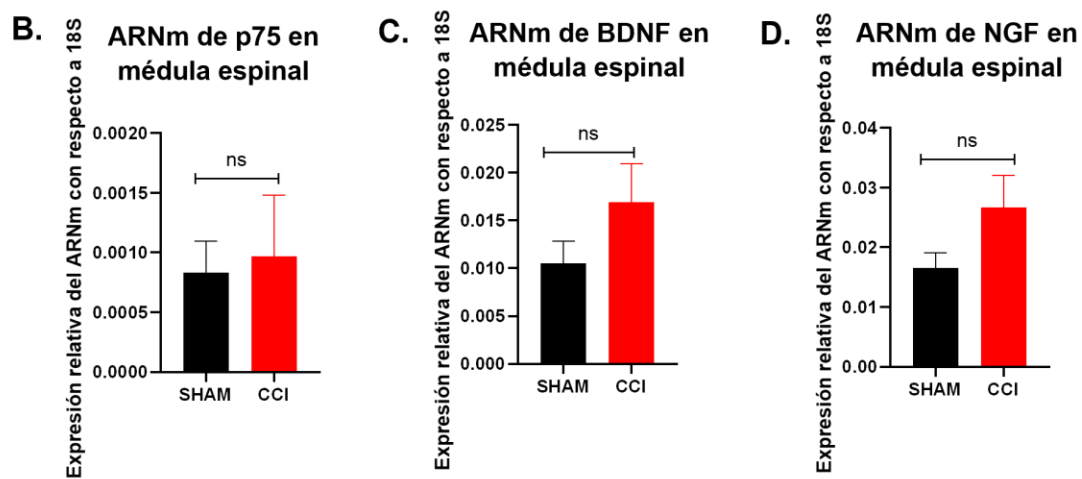


Figura 10. Expresión relativa del ARNm de las neurotrofinas NGF y BDNF, junto a sus receptores p75, TrkA y TrkB en la zona lumbar de la médula espinal. (A) Gel de agarosa representativo de la extracción de ARN total de la zona lumbar de la médula espinal. (B) Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de *p75* en la zona lumbar de la médula espinal. (C) Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de *BDNF* en la zona lumbar de la médula espinal. (D) Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de *NGF* en la zona lumbar de la médula espinal. (E) Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de *TrkB* en la zona lumbar de la médula espinal. (F) Cuantificación de la expresión relativa del ARNm de *TrkA* en la zona lumbar de la médula espinal. (G) Gel de agarosa representativo de los productos de qPCR obtenidos. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM. N= 5 ratones de zonas lumbares de la médula espinal de animales CCI y zonas lumbares de la médula espinal de los animales SHAM. Para el análisis estadístico se utilizó test t-student no pareado (ns: diferencias no significativas)

9.4 Localización del receptor de neurotrofinas p75 en distintos tipos celulares presentes en médula espinal de un modelo de dolor neuropático.

En consideración de que el receptor de neurotrofinas p75 incrementa su expresión en GRD en modelos animales de dolor neuropático, así como en médula espinal en modelos animales de dolor crónico (Fukui et al., 2009; Li et al., 2023), evaluamos la variación de la expresión de este receptor en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral de ratones modelo de dolor neuropático y su respectivo control. Junto a esto, se evaluó la colocalización de p75 con diferentes tipos celulares en cortes transversales de médula espinal, dentro de los cuales se destacan neuronas, astrocitos y microglía.

Los resultados muestran un incremento del receptor de neurotrofina p75 en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal de los animales CCI al compararlos con el lado contralateral del mismo animal (**figura 11A**). Así mismo, al comparar el asta dorsal ipsi lateral de los animales CCI v/s el asta dorsal ipsi lateral de los animales SHAM, se observa el incremento de la fluorescencia en los animales con el nervio ciático ligado (**figura 11C**). Los análisis de cuantificaciones entre las regiones dorsales ipsilaterales de ratones CCI y controles, indican un incremento significativo del receptor de neurotrofinas p75 en dolor crónico ($(0.0005705 \pm 3,071 \times 10^{-5}$ en ratones DN y $0,0004136 \pm 3,071 \times 10^{-5}$ en ratones SHAM) (**figura 11B**)

Para determinar en cuál subpoblación celular se produce el incremento de p75, se realizó inmunohistoquímica con fluorescencia en cortes transversales lumbares de médula espinal de p75 en conjunto con el marcaje de cuerpos neuronales (NeuN). Los resultados no muestran a p75 localizado en el núcleo de las neuronas presentes en la médula espinal de ratones CCI ni de los animales control, indicando que este receptor no se expresa en los cuerpos neuronales de la médula espinal (**figura 11B y 11C**).

Continuando con el análisis de localización celular de p75, se analizó la expresión de este receptor en astrocitos, que rodea, nutre y protege a las neuronas (Guillamón-Vivancos et al., 2015). Para eso se realizó una inmunohistoquímica con fluorescencia en cortes transversales de médula espinal de animales CCI y SHAM y se marcaron con el anticuerpo anti-p75 y anti-GFAP para analizar si este receptor se co-expresa en ese tipo celular. Los resultados indican el incremento de p75 en el asta dorsal de la médula espinal de los animales del grupo CCI al compararlos con el del grupo SHAM (**figura 12A**). Sin embargo, p75 no muestra coexpresión con astrocitos de la médula espinal, ni en animales CCI ni en los animales control (**figura 12B**).

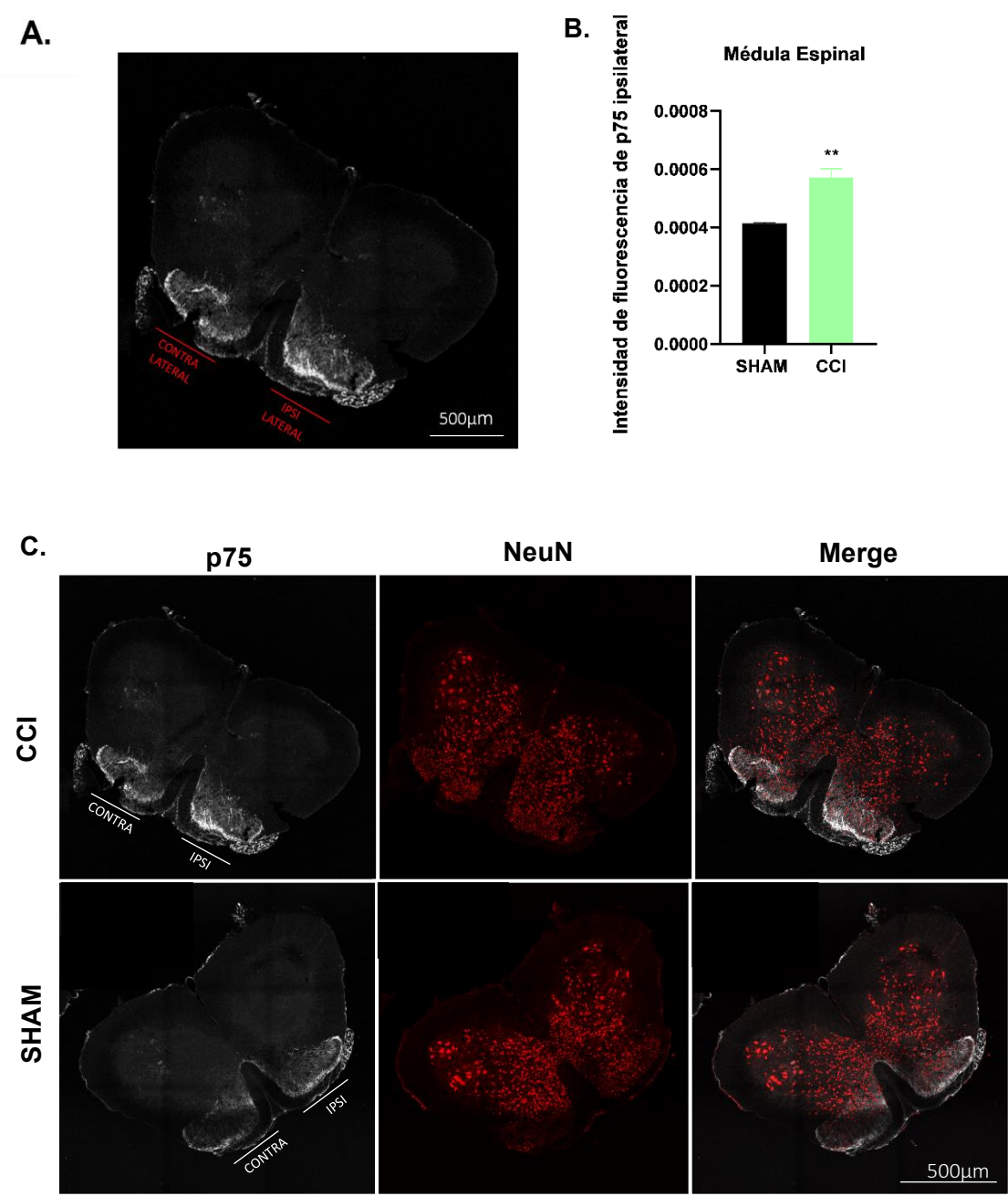
En esta dirección, también se analizó la expresión del receptor de neurotrofina p75 en microglía, células que dan soporte y protección a las neuronas. Para eso nuevamente se realizó una inmunohistoquímica con fluorescencia en cortes transversales de médula espinal de animales CCI y SHAM y se marcaron con el

anticuerpo anti-p75 y anti-Iba1 para microglía. Los resultados nuevamente indicaron el incremento de p75 en el asta dorsal de los ratones CCI al compararlos con los ratones SHAM (**figura 13A**). Junto a lo anterior, se observó microgliosis en toda la médula espinal de los animales CCI, indicando la sobreexpresión de este tipo celular en modelo de dolor neuropático (**figura 13A**). Los resultados indican que p75 es coexpresado con microglía en las zonas más externas de la región dorsal de la médula espinal, específicamente en las primeras láminas

Finalmente se caracterizó la expresión de TrkB y BDNF en cortes transversales de médula espinal de ambos grupos animales, CCI y SHAM, a través de inmunohistoquímica con fluorescencia. Los resultados indicaron un incremento de BDNF en toda la médula espinal, tanto en la zona dorsal como ventral de los animales CCI al compararlos con su respectivo control. La intensidad de fluorescencia de BDNF en ratones modelo de dolor neuropático fue mayor en comparación con los controles. Por otra parte, la expresión de TrkB, receptor de alta afinidad para BDNF, no varió significativamente su expresión en médula espinal al comparar ambos grupos de animales (**figura 14**).

En su conjunto, los resultados indican que p75 incrementa su expresión en el asta dorsal de la médula espinal en ratones modelo de dolor neuropático, específicamente en las capas más externas del asta dorsal colocaliza con

microglía. Sin embargo, el incremento de p75 no es producido ni en astrocitos ni en neuronas.



D.

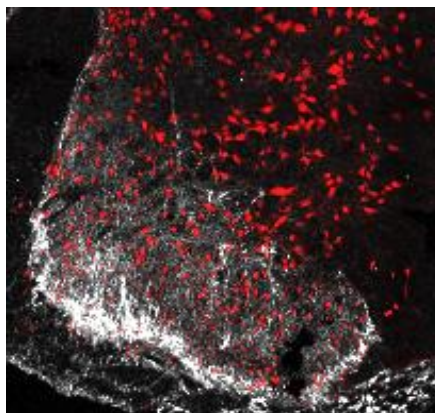


Figura 11. El receptor de neurotrofina p75 no se co-expresa en neuronas del asta dorsal en la médula espinal. Reconstrucción de imágenes 20X de cortes transversales totales de médula espinal en microscopio confocal SP8 LIGHTNING (Leica). **(A)** Inmunotinción de la expresión del receptor de neurotrofina p75 (blanco), comparando el lado ipsi del contra lateral. Barra de tamaño: 500 μ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del receptor de neurotrofina p75 en el lado ipsilateral de animales CCI y SHAM. **(C)** Panel de imágenes de inmunotinción de la expresión del receptor de neurotrofina p75 (blanco) y neuronas (rojo) en la médula espinal, comparando animales CCI y SHAM. Barra de tamaño: 500 μ m **(D)** Ampliación digital de imagen confocal mostrando colocalización entre el receptor de neurotrofinas p75 (blanco) y astrocytos (rojo) del animal CCI. Barra de tamaño: 500 μ m (n=3 CCI y n=3 SHAM). Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM de los cortes de 3 zonas lumbares de la médula espinal de animales CCI y 3 zonas lumbares de la médula

espinal de los animales SHAM. Para el análisis estadístico se utilizó test t-student no pareado (ns: diferencias no significativas, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

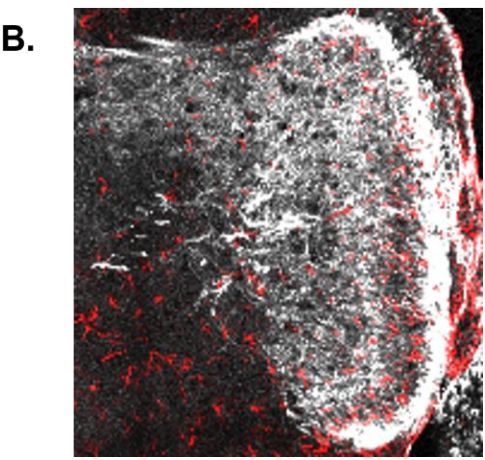
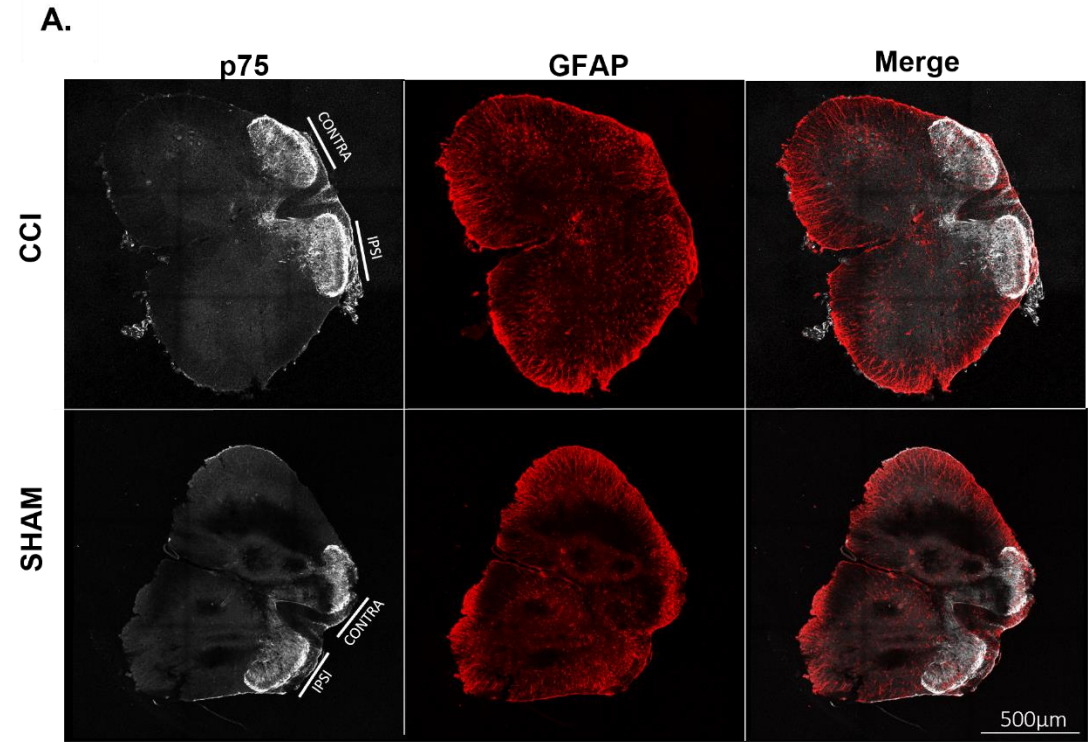


Figura 12. El receptor de neurotrofina p75 no co-localiza con astrocitos en el asta dorsal de la médula espinal. Reconstrucción de imágenes 20X de cortes transversales totales de médula espinal en microscopio confocal SP8 LIGHTNING (Leica). **(A)** Panel de imágenes de inmunotinción de la expresión del receptor de neurotrofina p75 (blanco) y astrocitos (rojo) en la médula espinal, comparando animales CCI y SHAM. Barra de tamaño: 500 μ m **(B)** Ampliación digital de imagen confocal mostrando colocalización entre el receptor de neurotrofinas p75 (blanco) y atrociitos (rojo) del animal CCI. Barra de tamaño: 500 μ m. (n=3 CCI y n=3 SHAM). Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM de los cortes de 3 zonas lumbares de la médula espinal de animales CCI y 3 zonas lumbares de la médula espinal de los animales SHAM.

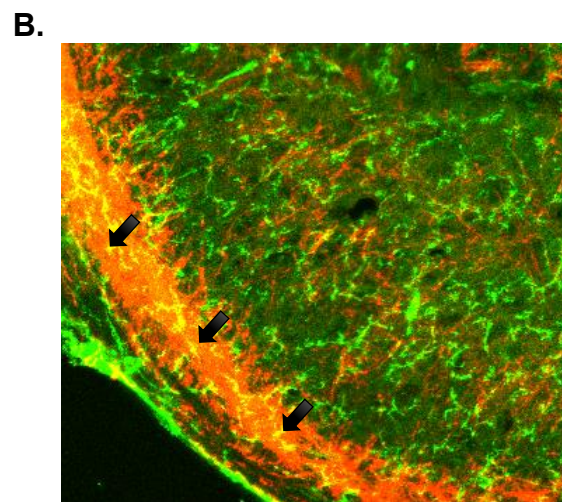
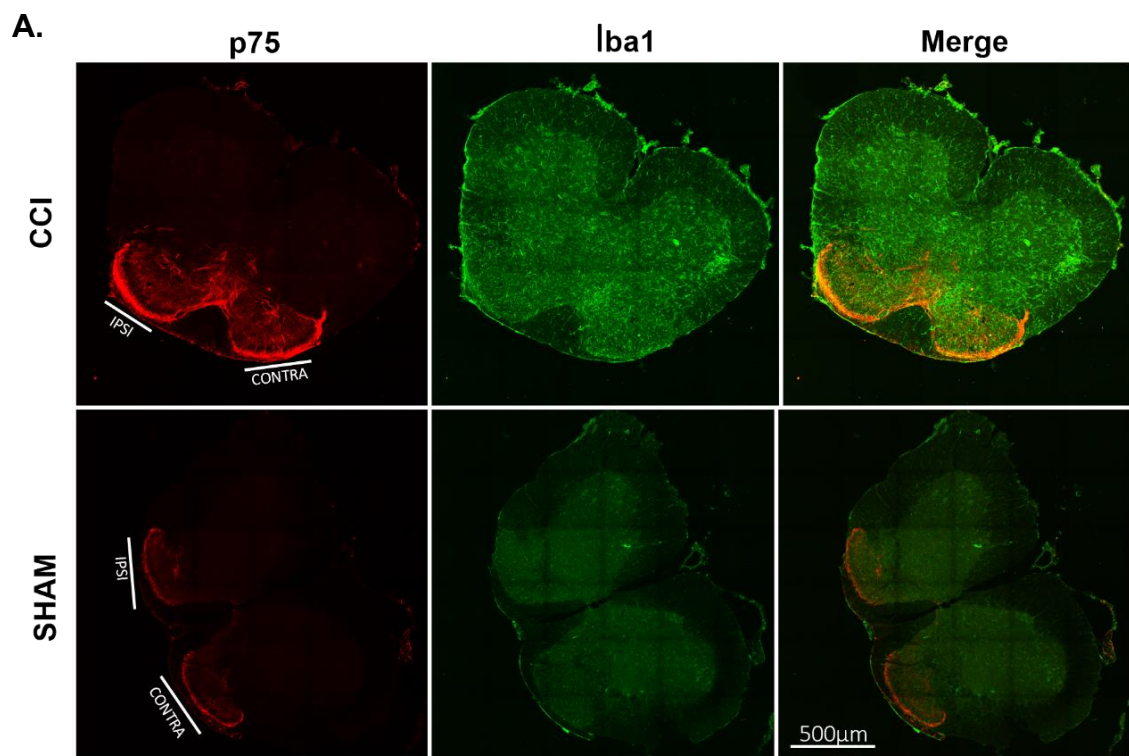


Figura 13. El receptor de neurotrofina p75 co-localiza con microglía en el asta dorsal de la médula espinal. Reconstrucción de imágenes 20X de cortes transversales totales de médula espinal en microscopio confocal SP8 LIGHTNING (Leica). **(A)** Panel de detección por inmunotinción de la expresión del receptor de neurotrofina p75 (rojo) en microglía (verde) en la médula espinal, comparando animales CCI y SHAM. Barra de tamaño: 500 μ m **(B)** Ampliación digital de imagen confocal mostrando colocación entre el receptor de neurotrofinas p75 (rojo) y microglía (verde) del animal CCI. (n=3 CCI y n=3 SHAM).

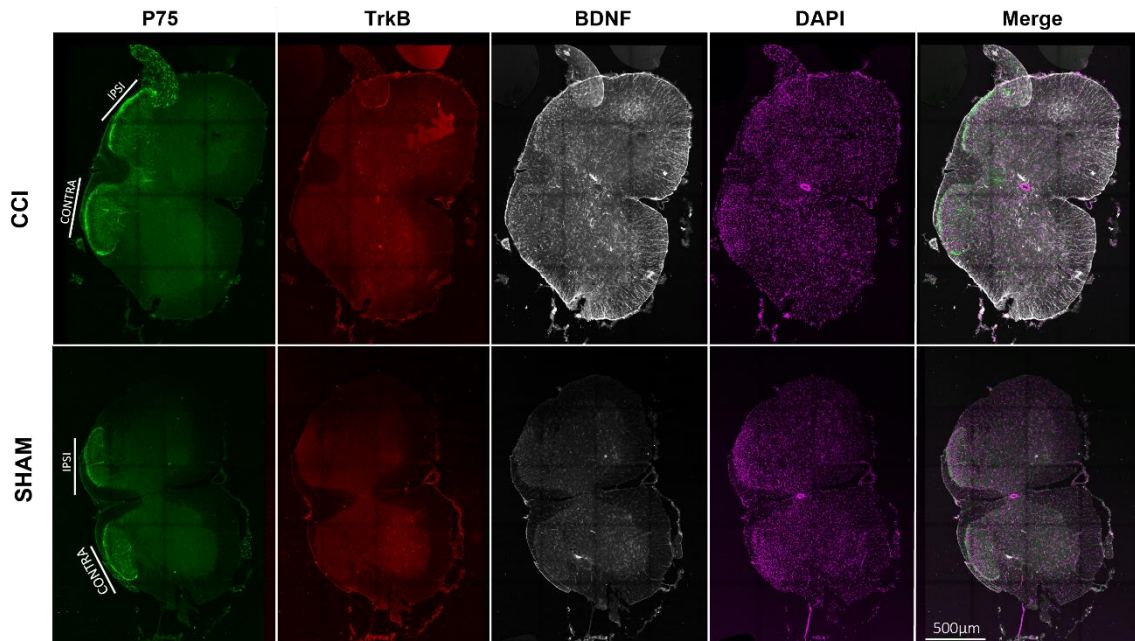


Figura 14. BDNF incrementa su expresión en la médula espinal luego de la ligación del nervio ciático, mas no su receptor de alta afinidad TrkB. Reconstrucción de imágenes 20X de cortes transversales totales de médula espinal en microscopio confocal SP8 LIGHTNING (Leica). **(A)** Panel de detección por inmunotinción de la expresión del receptor de neurotrofina p75 (verde), TrkB (rojo) y BDNF (blanco) en la médula espinal, comparando animales CCI y SHAM. Barra de tamaño: 500 μm . (n=3 CCI y n=3 SHAM)

10 DISCUSIÓN

El dolor crónico neuropático es una enfermedad que afecta a 15 de cada 100 personas en América Latina. En Chile, los cuadros más frecuentes asociados a esta enfermedad son: dolor lumbar con componente neuropático (34,2%); neuropatía diabética (30,4%); neuralgia post herpética (8,7%) y dolor neuropático como secuela postquirúrgica (6,1%) (V. Maritza Velasco, 2014). Datos actuales sugieren que anualmente los tratamientos para sobrellevar el dolor crónico, incluyendo el abordaje clínico para la depresión y la ansiedad, podrían ocupar alrededor del 5% del costo total de salud (Espinoza et al., 2022). Por otro lado, los fármacos utilizados para sobrellevar el DN tienen un éxito limitado, debido a la acotada información que se maneja sobre los mecanismos fisiopatológicos que desarrollan y mantienen esta patología (Petroianu et al., 2023).

Es por eso, que los modelos murinos para el estudio de esta enfermedad han sido fundamentales para entender las alteraciones neuroadaptativas en los circuitos moduladores del DN (Bannister et al., 2020), permitiendo así caracterizar diferentes mecanismos moleculares y celulares que participan en el desarrollo de la patología y subyacen las distintas condiciones de dolor.

10.1 Efecto del modelo de dolor neuropático por constricción del nervio ciático en ratones.

Existe una necesidad constante de generar modelos de dolor crónico válidos y fácilmente reproducibles para el estudio a nivel celular y molecular del DN; fundamentalmente para construir una imagen global de las proteínas claves que participan, los sistemas de señalización y cómo varían los circuitos neuronales en el desarrollo de esta enfermedad. Es por eso, que uno de los modelos animales más utilizados para el estudio de neuropatías periféricas en el modelo por constricción del nervio ciático (CCI) (Amteshwar et al., 2011; Bennett & Xie, 1988), utilizado específicamente en esta investigación. Los resultados obtenidos, indican el incremento de la hipersensibilidad mecánica específicamente en la extremidad posterior izquierda, la cual fue intervenida mediante constricción del nervio ciático. El umbral mecánico disminuyó a partir del día 1 posterior a la cirugía, alcanzando valores significativos luego de 3 días. Al compararlos con los animales controles, se confirmó que el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica sólo ocurrió en aquellos intervenidos con ligadura del nervio ciático. Estos datos se correlacionan con estudios anteriores en modelos de CCI generados en ratas, donde luego de una semana post cirugía se observó el desarrollo de hiperalgesia térmica y alodinia mecánica en la pata operada, extendiéndose hasta 7 semanas (De Vry et al., 2004). Junto a esto, la asimetría postural luego a la cirugía, el lamido excesivo y la cojera de la pata trasera

ipsilateral, son signos conductuales de dolor espontáneo generado por el modelo (Amteshwar Singh Jaggi et al., 2011); evidencia que también se observó en los ratones utilizados para esta investigación. Por otro lado, a pesar de que amplia data mantiene el modelo CCI por más de 2 semanas (De Vry et al., 2004; Gopalsamy et al., 2019; Chen et al., 2021; Wang et al., 2021), la evidencia expuesta en esta investigación sugiere que es suficiente mantener el modelo por 7 días, puesto que la disminución del umbral mecánico alcanzó significancia a partir del día 3 post cirugía, junto a que hasta el día 7, se extiende el peak de dolor en este modelo y es un tiempo promedio para generar plasticidad sináptica que permite desarrollar la enfermedad a través del tiempo (Kuner & Flor, 2016). Por ende, datos como estos apoyan el correcto diseño del modelo de dolor neuropático, mostrando el incremento de la hipersensibilidad mecánica sólo en la pata trasera izquierda de animales CCI y que el tiempo de análisis de los datos sea en el séptimo día post cirugía.

Existen otros tipos de modelos de DN bien documentados, que también demuestran el desarrollo de hipersensibilidad mecánica en poco tiempo, como, por ejemplo, el modelo de ligadura del nervio espinal (SNL), dirigido al daño en las raíces dorsales del nervio ciático, o el modelo de lesión nerviosa evitada (SNI), el cual permite el estudio por separado de dos de las tres ramas terminales del nervio ciático (Meacham et al., 2017; Abboud et al., 2021; Amteshwar Singh Jaggi et al., 2011). Ambos, tienen la capacidad de homologar algunos síndromes neuropáticos en humanos como por ejemplo radiculopatía lumbar, isquemia focal,

síndrome de dolor lumbar, entre otros. Sin embargo, a pesar de que existen diversos modelos útiles para el estudio esta enfermedad, debido a la variada etiología que tiene el DN, no se ha considerado hasta ahora un modelo superior al otro, puesto que cada uno tiene diferentes enfoques (Amteshwar et al., 2011; Abboud et al., 2021; Leong et al., 2016). Aunque, el modelo CCI se considera de fácil replicación, a diferencia de los anteriores mencionados, además de tener la capacidad de generar alodinia mecánica hasta con una sola ligadura en el nervio ciático (Medeiros et al., 2019; Gopalsamy et al., 2019). Junto a esto, se ha comprobado que la generación de este modelo no sólo involucra componentes neuropáticos, si no también inflamatorios, dentro de los cuales se destacan el incremento de citoquinas, prostaglandinas, factores neurotróficos, sustancia P, entre otros (Gopalsamy et al., 2019; Abboud et al., 2021; Meacham et al., 2017). Esto debido a que la ligación del nervio induce inflamación local e hinchazón, aumentando la constricción del nervio durante varios días (Chen et al., 2021; Wang et al., 2021). Esto provoca la activación de microglía y macrófagos que invaden el sitio de la lesión (Hu et al., 2007), liberando así proteínas que favorecen la inflamación desde la periferia hasta el SNC, las cuales podrían ser trascendentales para el desarrollo y mantención del DN.

10.2 Caracterización de neurotrofinas y sus receptores de alta afinidad en dolor neuropático.

Las neurotrofinas son factores del crecimiento requeridos por distintos tipos de células neuronales para la supervivencia y el mantenimiento del SNP y SNC (Allen & Dawbarn, 2006; Huang & Reichardt, 2001; Siniscalco et al., 2011; Pezet & McMahon, 2006). Estas últimas décadas han tomado relevancia por su participación en el desarrollo y mantención de diversas enfermedades, siendo una de estas el dolor neuropático (Meacham et al., 2017; Pezet, 2014; Barker et al., 2020). En esta dirección, NGF ha sido ampliamente reportado como mediador periférico del dolor a través del transporte retrógrado de NGF/TrkA desde las neuronas nociceptivas hacia los cuerpos celulares en el GRD (Pezet, 2014; Hirose et al., 2015; Norman & McDermott, 2016; Barker et al., 2020). Esto permite la activación de mediadores inflamatorios como bradicinina, histamina, ATP, entre otros, lo que puede generar sensibilización neuronal que se manifiesta como hipersensibilidad al dolor (Barker et al., 2020; Delcroix J.D. et al., 2003). Adicionalmente, la administración subcutánea de NGF en ratas adultas indujo hiperalgesia plantar y dolor muscular (Hirose et al., 2015). Junto a esto, ensayos clínicos de anticuerpos neutralizantes contra NGF han mostrado analgesia en diversos modelos animales de dolor neuropático, ratificando la participación de esta neurotrofina como mediador del dolor (Denk et al., 2017).

Bajo nuestros parámetros experimentales, el modelo CCI no indujo un incremento significativo de los genes de *NGF* y *TrkA*, en la zona lumbar de la médula espinal, luego de 7 días post ligadura del nervio ciático. Sin embargo, datos colaborativos anteriores a esta investigación mostraban un incremento de estos genes en el modelo CCI, por lo tanto se sugiere la posible participación del ligando junto a su receptor de alta afinidad en dolor neuropático según la data anteriormente expuesta. No obstante, el incremento de ambas proteínas ha sido mayormente descrito en el SNC en distintos modelos de dolor crónico, incluyendo modelos de DN (Pezet, 2014; Denk et al., 2017; Terada et al., 2018; Ro et al., 1999), por ende, los valores no significativos de estos genes podrían deberse a que esta neurotrofina y su receptor de alta afinidad no incrementan drásticamente su expresión en el SNC, si no que contribuyen a la hipersensibilidad nociceptiva desde la periferia (Barker et al., 2020). Por otra parte, si bien otros estudios muestran un incremento en la expresión génica de *NGF* y no de *TrkA* en ratones modelo de DN, esto no implica un aumento en la expresión proteica de este ligando y su receptor. Diversos moduladores moleculares, como las proteínas CREB y STAT3 (Yang et al., 2021), pueden influir en la traducción del ARNm de *NGF* y *TrkA*, modulando la cantidad de proteínas sintetizadas. Por lo tanto, es necesario realizar análisis adicionales para determinar la influencia específica de estos moduladores en la síntesis de proteínas en el contexto del dolor neuropático.

NGF puede contribuir a la sensibilización central a través del incremento de los niveles de BDNF, que se transporta anterógradamente hacia las terminales centrales de las aferentes primarias en el asta dorsal de la médula espinal (Barker et al., 2020; Terada et al., 2018, Nijs et al., 2014).

En esta dirección, BDNF, al igual que NGF se considera neuromodulador endógeno de las vías nociceptivas en procesos de dolor crónico, especialmente a nivel del SNC (Pezet, 2014; Obata et al., 2006; Nijs et al., 2014). Esta neurotrofina aumenta la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica en modelos de DN (Geng et al., 2010; Shu & Mendell, 1999; Obata & Noguchi, 2006), además de estar involucrada en la plasticidad espinal y la sensibilización central, por lo que desempeña un papel crítico en el desarrollo de esta enfermedad. Bajo nuestro parámetros experimentales, la expresión génica del gen *BDNF* no evidenció un incremento significativo en la zona lumbar de la médula espinal luego de 7 días post ligadura del nervio ciático. Junto a esto, los valores de expresión proteica de BDNF, no mostraron una variación significativa en la zona lumbar de ratones modelo DN. Para un análisis más preciso, se optó por disgregar la médula espinal y sólo analizar el asta dorsal, región del procesamiento del dolor en la médula espinal donde se produce la conexión entre las fibras nociceptivas y el SNC. Los resultados de la expresión proteica de BDNF volvieron a mostrar una leve tendencia al incremento sin resultados significativos al comparar ambos grupos animales. Estos datos se correlacionan con las imágenes obtenidas de la inmunohistoquímica fluorescente que se realizó de la

zona lumbar de la médula espinal luego de 7 días post cirugía, donde se muestra el incremento de BDNF en toda la región medular de los animales CCI, sin restricción al asta dorsal como se ha descrito en estudios previos (Geng et al., 2010)

Esta aparente discrepancia podría explicarse por la cinética de expresión de BDNF, caracterizada por un pico inicial en las primeras horas post lesión, seguido por una disminución gradual de su concentración a nivel espinal en el transcurso de los días (Geng et al., 2010; Li et al., 2008; Nijs et al., 2014). Es probable que, al momento del análisis, los niveles de BDNF en el grupo CCI ya hubieran retornado a valores basales similares a los del grupo control, lo que explicaría la ausencia de diferencias significativas. Sin embargo, el hecho de no encontrar un incremento de BDNF en el asta dorsal al día 7 post generación del modelo, no indica la exclusión de la participación de esta neurotrofina en la sensibilización central, sino que es necesario analizar proteínas que participen en señalización intracelular desencadenada por la unión de BDNF a sus receptores para obtener un análisis en mayor profundidad respecto a cómo participa esta neurotrofina en el desarrollo del dolor neuropático. El aumento del número de ratones será requerido en análisis futuros para poder evaluar el posible incremento de BDNF.

De igual modo se analizó la expresión del receptor de alta afinidad para BDNF, TrkB. Este receptor tirosina quinasa incrementa su expresión luego de lesiones periféricas y se ha descrito que ciertas isoformas participan en dolor neuropático

(Narita et al., 2000; Wu et al., 2013). Nuestros resultados sugieren una tendencia al incremento de la expresión del gen *TrkB* en la médula espinal, al igual que una tendencia al incremento de su expresión proteica luego de 7 días de la ligadura del nervio ciático. No obstante, los resultados no fueron significativos al comparar ambos grupos animales, por lo que se decidió disgregar la médula espinal y analizar nuevamente sólo el asta dorsal. En esa dirección, los resultados obtenidos indican un incremento significativo de TrkB en el asta dorsal de la médula espinal de los animales CCI, por lo que su mayor presencia se podría relacionar con el incremento inicial de BDNF. Estudios previos apoyan estos resultados (Geng et al., 2010). Se ha descrito un aumento significativo de la expresión proteica de TrkB en las primeras horas posteriores a la lesión, que se mantiene hasta el día 7, concordante con los datos obtenidos. Para determinar si TrkB posee un rol activo en la sensibilización central se requieren estudios adicionales para comprender los mecanismos moleculares que subyacen el desarrollo del dolor neuropático.

10.3 Receptor de neurotrofina p75 incrementa su expresión en médula espinal en dolor neuropático

El receptor de neurotrofina p75 es una proteína transmembrana que se expresa principalmente en el sistema nervioso en etapas del desarrollo, favoreciendo

procesos sinaptogénicos y muerte celular programada (Dechant & Barde, 2002; Ibáñez & Simi, 2012; Underwood & Coulson). Aunque su expresión disminuye en la adultez, p75 ha cobrado relevancia estas últimas décadas por su participación en la neuroinflamación, la supervivencia y muerte celular luego de una injuria, posiblemente contribuyendo al mantenimiento del dolor, ya sea señalizando individualmente, o unido a receptores Trks, Sortilina, Nogo o Lingo-1 (Underwood & Coulson, 2008; Irmady et al., 2014; Volosin et al., 2008). En este contexto, esta investigación analizó la expresión de p75 en la médula espinal en un modelo murino de dolor neuropático luego de 7 días post constricción del nervio ciático. La expresión génica de *p75* no se diferenció entre ratones CCI y SHAM. La expresión proteica del receptor también mostró una tendencia al alza en los animales CCI, nuevamente sin alcanzar valores significativos al compararlos con los animales control en extractos lumbares totales. Motivados por recientes investigaciones que sugieren un incremento de p75 en el asta dorsal de la médula espinal en modelo de dolor crónico inducido por CFA (Li et al., 2023), se decidió realizar una disección de la médula para evaluar específicamente esta región, zona principal del SNC donde se procesan señales nociceptivas. Los nuevos resultados mostraron un incremento significativo de la expresión proteica de p75 en los animales CCI luego de 7 días post cirugía. Este hallazgo se consolidó con imágenes de inmunohistoquímica, que revelaron la presencia de p75 circunscrita en las primeras láminas del asta dorsal de la médula espinal. En consecuencia, estos experimentos proporcionan una sólida validación a la hipótesis planteada

en este estudio, indicando el incremento de p75 en la médula espinal en dolor neuropático. Más aún, el incremento significativo de p75 se concentra en el lado ipsilateral de la médula espinal, correspondiente al lado izquierdo del animal donde se realizó la intervención quirúrgica. Esto sugiere la especificidad con la cual p75 incrementa su expresión y posible función en la región dorsal de la médula frente a DN.

Si bien los resultados previos confirman la expresión de p75 en esta patología, para un análisis en mayor profundidad se examinó en qué tipo celular se localizaba este receptor para comprender mejor su papel en la modulación del dolor. La especificidad celular es crucial para entender mecanismos moleculares subyacentes y para identificar potenciales células dianas terapéuticas. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos adicionales para analizar la expresión y localización de p75 en diferentes tipos celulares del asta dorsal de la médula espinal. Estos datos complementarios, que examinaron al receptor en neuronas, astrocitos y microglía, proporcionaron información crucial sobre la distribución celular de p75 y su posible rol en la patogénesis del DN. Los resultados de la localización subcelular a través de inmunohistoquímica no mostraron a p75 en neuronas ni en astrocitos en la médula espinal luego de 7 días post ligadura del nervio ciático. Sin embargo, si se observó la presencia del receptor en microglía en las láminas más externas del asta dorsal. La microglía participa en el desarrollo de células neuronales, la homeostasis y casi todas las alteraciones que afectan al SNC (Nayak et al., 2014). La lesión en los nervios periféricos

potencia la actividad de las neuronas sensoriales, promoviendo la activación de la microglía en el asta dorsal (Boakye et al., 2021), datos concordantes con los datos obtenidos mediante imágenes de inmunohistoquímica de médula espinal, donde se observa microgliosis en los animales CCI al compararlos con sus respectivos controles. Estudios han relacionado la activación de este tipo celular en modelos murinos de dolor neuropático con las conductas de dolor, mostrando una posible desregulación homeostática a nivel central que provoca un estado prolongado de la hipersensibilidad debido al incremento en los niveles de purinoceptor 4 P2X (P2X4) BDNF, TrkB, p38 MAPK, entre otros (Tsuda et al., 2003; Jin et al., 2003; Raghavendra et al., 2003). Si bien p75 ha sido mayormente caracterizado en diferentes células del GRD, donde su expresión aumentada se asocia con alodinia mecánica tras una lesión periférica (Fukui et al., 2009; Obata et al., 2006), su función en la microglía aún no está completamente dilucidada. Los nuevos hallazgos sobre la expresión de p75 en la microglía del asta dorsal de la médula espinal en un modelo de dolor neuropático abren nuevas interrogantes sobre su funcionamiento y su posible contribución a la sensibilización central.

Aún cuando si se observó a p75 colocalizando con la microglía en las primeras capas del asta dorsal de la médula espinal, existe una amplia región de la zona dorsal donde p75 es expresado y no colocaliza con la microglía. Estudios futuros se enfocarán en elucidar cual es la población celular específica en la cual incrementan los niveles de p75 durante el DN.

Para comprender mejor la función de p75 en la médula espinal en el contexto de dolor neuropático, se analizaron las proteínas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), ERK y JNK. Estas proteínas desempeñan un papel crucial en la transducción de señales intracelulares y pueden ser activadas por la unión de neurotrofinas al receptor p75, mediando procesos de supervivencia y muerte celular respectivamente (Zhuang et al., 2005, Tep et al., 2013). Los resultados mostraron un incremento significativo de la expresión proteica de p-ERK (proteína ERK activada por fosforilación) en el asta dorsal de la médula espinal en los animales con ligadura del nervio ciático. Sin embargo, futuros estudios determinarán en qué tipo celular se produjo este aumento y si es concordante con el incremento de p75. Estudios previos en modelos de ligadura del nervio espinal (SNL) han demostrado que la activación de ERK se induce en neuronas de la médula espinal en primera instancia, seguido de su incremento en microglía, la cual se mantiene durante varios días. Junto a esto, el bloqueo de la activación de ERK mediante el inhibidor MEK (inhibidor de quinasa ERK) suprime la alodinia mecánica luego de 2 días, lo que indicaría la participación de microglía en el desarrollo del DN (Zhuang et al., 2005; Zhen et al., 2023). Por otra parte, bajo nuestros parámetros experimentales, la expresión proteica de p-JNK (JNK activada por fosforilación) no mostró diferencia significativa. Estos datos discrepan de otros modelos de DN, donde el incremento persistente de JNK en astrocitos de la médula espinal luego de la ligadura del nervio espinal (modelo SNL) contribuye a la sensibilización al dolor a través de mecanismos neuronales

y gliales (Zhi et al., 2006). Sin embargo, a pesar de no obtener significancia en los valores de la expresión de p-JNK, no se puede descartar su participación en el desarrollo del DN, por lo que es necesario identificar más objetivos moleculares que median a JNK a través de la activación de p75.

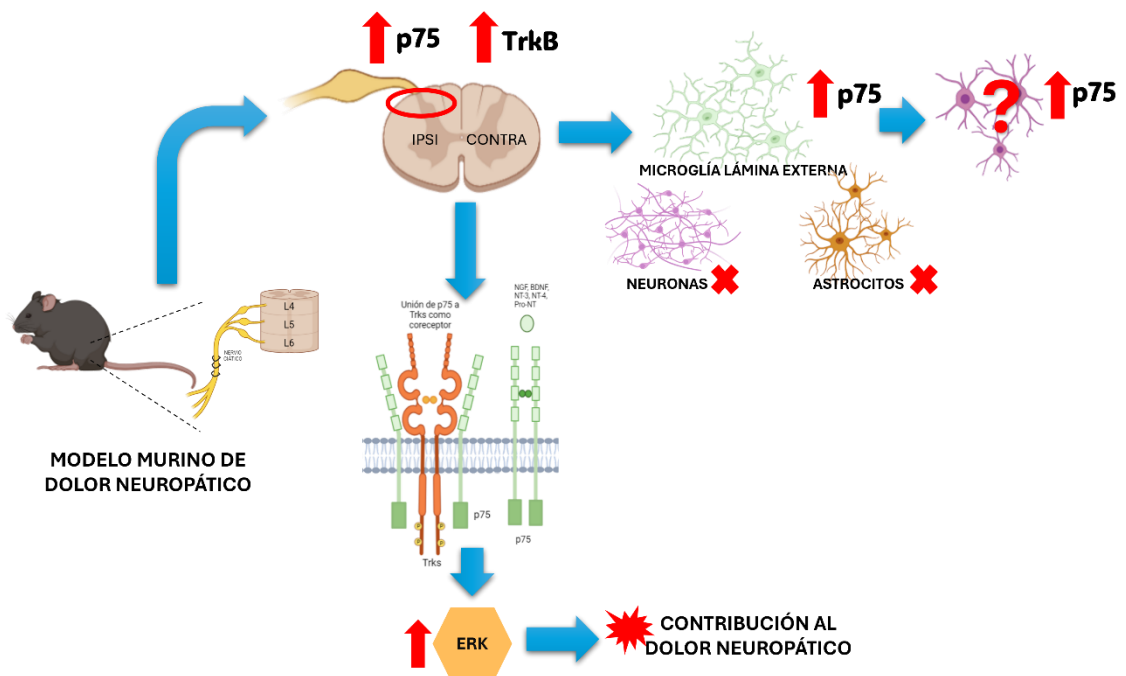


Figura 15. Resumen gráfico de los principales datos obtenidos de la caracterización de p75. Esquema representativo del incremento de p75 en el asta dorsal de la médula espinal de un modelo murino de dolor neuropático.

11 CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio proporcionan evidencia de que receptor p75 juega un papel importante en la modulación del dolor neuropático a nivel medular. Se observó un aumento significativo de la expresión de p75 en las primeras láminas del asta dorsal de la médula espinal en el modelo de dolor neuropático inducido por CCI, región clave en el procesamiento de las señales nociceptivas. Este hallazgo cobra relevancia al sugerir una modulación de la nocicepción por parte de p75, ya sea actuando de forma independiente o en conjunto con los receptores Trk. Adicionalmente, este estudio aporta evidencia del incremento del receptor TrkB, así como de la activación de la proteína ERK (p-ERK). Su localización en microglía en las primeras capas del asta dorsal sugieren una posible mediación a través de p75 en la neuromodulación del dolor asociado a la activación de la señalización de ERK y su posible asociación a la microglía espinal. Esta activación podría contribuir al DN a través de la modulación de la respuesta inflamatoria y la liberación de citoquinas. Sin embargo, investigaciones adicionales serán requeridas para determinar las contribuciones celulares específicas y los mecanismos moleculares subyacentes desencadenados por p75 en la neurofisiología del dolor neuropático.

En su conjunto, la presente investigación contribuye con un avance significativo en la comprensión de la expresión y potencial rol del receptor p75 en la médula espinal durante el dolor neuropático, abriendo nuevas posibilidades para el

desarrollo de estrategias terapéuticas más precisas y efectivas para el tratamiento de esta patología y posicionando al receptor de neurotrofinas p75 como componente molecular activo en la regulación del dolor crónico.

12 ANEXO

Manejo de residuos: El manejo de residuos se realizó según los reglamentos de la Universidad de Concepción a través de MATPEL, respetando las cláusulas del Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos asociados, actualizado en el año 2018 por Fondecyt y CONICYT. Todo el material microbiológico fue inactivado por hipoclorito de sodio al 10%, mientras que los animales de experimentación sacrificados se congelaron y almacenaron a -20°C previa entrega a MATPEL



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y
Desarrollo Comité de Ética, Bioética y
Bioseguridad

CEBB 1557-2023

Concepción, octubre de 2023.

CERTIFICADO

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción ha revisado el **PROYECTO N° 2023000763INI**, titulado **“ROLE OF P75 NEUROTROPHIN RECEPTOR TO NOCICEPTION AND CHRONIC PAIN”**, adjudicado en el **CONCURSO DE PROYECTOS VRID INICIACIÓN**, presentado por la **DRA. VIVIANA PÉREZ FERNÁNDEZ**, académica adscrita al Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Mediante un detenido análisis, el Comité ha comprobado que el referido proyecto, cumple con las normas y procedimientos éticos y bioéticos establecidos nacional e internacionalmente para estudios que consideran la participación de personas y la manipulación de material biológico, en esta investigación, de origen humano.

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial o descrita en términos de dicho daño. Clínicamente, el dolor crónico se define como una hipersensibilidad al dolor de larga duración que persiste más de tres meses y puede ser generado por estímulos específicos o estados patológicos. En este contexto, desde el 2022, en si mismo, el dolor crónico se enmarca como una patología.

En base a lo anterior, en el **PROYECTO VRID N° 2023000763INI** se plantea como objetivo general, determinar si la actividad del receptor p75 a nivel del ganglio de la raíz dorsal y de la médula espinal contribuye a la nocicepción y al desarrollo y mantenimiento del dolor crónico.

Para ello, se plantea ejecutar la investigación en 24 meses, sobre la base de 03 (tres) objetivos específicos, que consideran: (1) caracterizar la expresión y la señalización desencadenada por p75 en modelos de dolor crónico; (2) determinar la contribución de la señalización de p75 al procesamiento sensorial y la nocicepción, y (3) determinar la contribución de la señalización de p75 al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático e inflamatorio crónico.

El proyecto pretende responder a la hipótesis mediante un enfoque integrador que utiliza ensayos moleculares, celulares, funcionales y conductuales combinados con ratones modificados genéticamente e inhibidores farmacológicos dirigidos al receptor p75. Así también, el desarrollo de los objetivos 2 y 3 mediante el diseño y generación del ratón knock-out del receptor de neurotrofinas p75 usando infección viral de CRISPR/Cas9 (AAV-PHP-S-sgp75-CRISPR) en ratones Cas9, se realizará en las dependencias de la Universidad Andrés Bello en Santiago. Los ratones macho y hembras Cas9, serán transportados bajo medidas de resguardo y alimentación hacia las dependencias del Departamento de Fisiología de la Universidad de Concepción. En este lugar se procederá a la infección viral de las crías Cas9 obtenidas de las cruces de estos ratones. De esta manera, se generarán ratones *knock out* para el receptor de p75 CRISPR/Cas9 (AAV-PHP-S-sgp75-CRISPR) en los cuales se anulará la expresión del receptor de neurotrofinas p75 en subpoblaciones neuronales específicas para su posterior análisis en el contexto de nocicepción (O.E.2) y dolor crónico (O.E.3). Esta tarea será ejecutada en Santiago, por el Inv. Asociado, Dr. Fernando Bustos.

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile





Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y
Desarrollo Comité de Ética, Bioética y
Bioseguridad

Estos animales, de modelo murino, corresponden a ratón (*Mus musculus*) / C57BL/6J y Cas9 JAX, machos, de 8 a 16 semanas, con 15 a 30 grs. de peso. Durante el año 1, se utilizará un total de 76 individuos de ratones C57BL/6J y 40 durante el segundo año. Ejemplares de RATONES CAS9, sólo serán empleados 52 durante el segundo año de ejecución de la investigación, todo conforme disposiciones de Reemplazo, Reducción y Refinamiento y bajo medidas de cuidado y uso de animales, supervisados por protocolos administrados por personal veterinario debidamente acreditado para tal acción. Todo se describe en detalle en la metodología del proyecto en pauta.

Las muestras biológicas se desecharán en solución de hipoclorito de sodio al 10% y posteriormente se esterilizarán mediante autoclave y serán almacenadas en contenedores específicos cerrados herméticamente que posteriormente será entregado para su retiro de acuerdo a las disposiciones específicas de MATPEL, en la Universidad de Concepción.

Todos los procedimientos con el uso de animales estarán pautados en la responsabilidad por el cuidado y bienestar animal, observando con estricto rigor al Principio de las 3'R (Russell y Burch, 1959), las pautas de *Canadian Council on Animal Care* – CCAC, el documento “Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal”, editado por el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT - CONICYT (2009) y las “Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados”, Versión 2018, editado por FONDECYT – CONICYT y adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID del Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación del Gobierno de Chile.

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción, considera que el **PROYECTO N° 2023000763INI**, titulado “**ROLE OF P75 NEUROTROPHIN RECEPTOR TO NOCICEPTION AND CHRONIC PAIN**”, adjudicado en el **CONCURSO DE PROYECTOS VRID INICIACIÓN**, presentado por la **DRA. VIVIANA PÉREZ FERNÁNDEZ**, en calidad de Investigador Responsable no presenta elementos transgresores a la Ley N° 20.380 sobre Protección de Animales, a las normas y los principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria y a los principios éticos establecidos en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación Resolución Exenta N° 157, de 2013 CONICYT, así como también no vulnera lo dispuesto en el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos, **siguió el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos MATPEL institucional y, observa además, las regulaciones legales nacionales contenidas en la Ley N° 20.393, que establece la responsabilidad penal de las personas jurídicas en los delitos que indica y**

Ley N° 21.369, que Regula el Acoso Sexual, la Violencia y la Discriminación de Género en el ámbito de la Educación Superior, y el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados 2018, formalizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT y adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.

DRA. MARÍA ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS
PRESIDENTA
COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



13 GLOSARIO

IASP: Asociación internacional para el Estudio del Dolor.

GRD: Ganglio de la raíz dorsal

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

CGRP: Péptido relacionado al gen de calcitonina

CFA: Adyuvante completo de Freund

CCI: Lesión por constricción crónica

DN: Dolor neuropático

TNF: Factor de necrosis tumoral

NGF: Factor del crecimiento nervioso

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

NT-3: Neurotrofina 3

NT-4: Neurotrofina 4

ProNT: Pro-neurotrofina

KCC2: Exportador de cloruro de potasio

Trks: Receptores tirosina-kinasa

MAPK/ERK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

PIK3: Fosfoinositol 3-quinasa

PLC: Fosfolipasa C

CREB: Proteína de unión a elemento de respuesta al AMPc

JNK: kinasa c-Jun N-terminal

NF-KB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células

B activadas

SNL: Ligadura del nervio espinal

WT: Wildtype

IHQ: Inmunohistoquímica

WB: Western Blot

14 BIBLIOGRAFÍA

1. Abboud, C., Duveau, A., Bouali-Benazzouz, R., Massé, K., Mattar, J., Brochoire, L., Fossat, P., Boué-Grabot, E., Hleihel, W., & Landry, M. (2021). Animal models of pain: Diversity and benefits. *Journal of neuroscience methods*, 348, 108997. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108997>
2. Allen, S. J., & Dawbarn, D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical science (London, England: 1979)*, 110(2), 175–191. <https://doi.org/10.1042/CS20050161>
3. 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>
4. Bell, A. F. (2018). The neurobiology of acute pain. *Veterinary Journal*, 237, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>
5. Berger, A. A., Liu, Y., Possoit, H. E., Rogers, A. C., Moore, W., Gress, K., Cornett, E. M., Kaye, A. D., Imani, F., Sadegi, K., Varrassi, G., Viswanath, O., & Urits, I. (2021). Dorsal root ganglion (DRG) and chronic pain. *Anesthesiology and Pain Medicine*, 11(2). <https://doi.org/10.5812/aapm>.
6. Boakye, P. A., Rancic, V., Whitlock, K. H., Simmons, D., Longo, F. M., Ballanyi, K., & Smith, P. A. (2019). Receptor dependence of BDNF actions in superficial dorsal horn: relation to central sensitization and actions of macrophage colony stimulating factor 1. *Journal of neurophysiology*, 121(6), 2308–2322. <https://doi.org/10.1152/jn.00839.2018>

7. 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>
8. Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348(feb05 6), f7656. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7656>
9. Denk, F., Bennett, D. L., & McMahon, S. B. (2017). Nerve growth factor and pain mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 307–325. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031121>
10. Descalzi, G., Ikegami, D., Ushijima, T., Nestler, E. J., Zachariou, V., & Narita, M. (2015). Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends in Neurosciences*, 38(4), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.02.001>
11. Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/jci42843>
12. Durán, J., Tejos-Bravo, M., Cid, V., Ferreccio, C., & Calvo, M. (2023). Chronic pain in Chile: first prevalence report of noncancer chronic pain, fibromyalgia, and neuropathic pain and its associated factors. *Pain*, 164(8), 1852–1859. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002886>
13. Esposito, M., Malayil, R., Hanes, M., & Deer, T. R. (2019). Unique characteristics of the dorsal root ganglion as a target for neuromodulation. *Pain Medicine*, 20(Supplement_1), S23–S30. <https://doi.org/10.1093/pm/pnz012>

14. 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>

15. Fukui, Y., Ohtori, S., Yamashita, M., Yamauchi, K., Inoue, G., Suzuki, M., Orita, S., Eguchi, Y., Ochiai, N., Kishida, S., Takaso, M., Wakai, K., Hayashi, Y., Aoki, Y., & Takahashi, K. (2009). Low affinity NGF receptor (p75 neurotrophin receptor) inhibitory antibody reduces pain behavior and CGRP expression in DRG in the mouse sciatic nerve crush model. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(3), 279–283. <https://doi.org/10.1002/jor.20986>

16. Geng, S. J., Liao, F. F., Dang, W. H., Ding, X., Liu, X. D., Cai, J., Han, J. S., Wan, Y., & Xing, G. G. (2010). Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Experimental neurology*, 222(2), 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.01.003>

17. Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>

18. Ibáñez, C. F., & Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in Neurosciences*, 35(7), 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.007>

19. Irmady, K., Jackman, K., Padow, V. A., Shahani, N., Martin, L. A., Cerchietti, L., Unsicker, K., Iadecola, C., & Hempstead, B. L. (2014). MIR-592 regulates the induction and cell Death-Promoting activity of P75NTR in neuronal ischemic injury. *The Journal of Neuroscience*, 34(9), 3419–3428. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1982-13.2014> Khan, N., & Smith,

- M. T. (2015). Neurotrophins and neuropathic pain: Role in pathobiology. *Molecules*, 20(6), 10657–10688. <https://doi.org/10.3390/molecules200610657>
20. Kraemer, B. R., Yoon, S. O., & Carter, B. D. (2014). The Biological Functions and Signaling Mechanisms of the p75 Neurotrophin Receptor. In *Handbook of experimental pharmacology* (pp. 121–164). https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_6
21. Lara, C. O., Murath, P., Muñoz, B., Marileo, A. M., Martín, L. S., San Martín, V. P., Burgos, C. F., Mariqueo, T. A., Aguayo, L. G., Fuentealba, J., Godoy, P., Guzman, L., & Yévenes, G. E. (2016). Functional modulation of glycine receptors by the alkaloid gelsemine. *British journal of pharmacology*, 173(14), 2263–2277. <https://doi.org/10.1111/bph.13507>
22. Lewin, G. R., & Nykjaer, A. (2014). Pro-neurotrophins, sortilin, and nociception. *European Journal of Neuroscience*, 39(3), 363–374. <https://doi.org/10.1111/ejn.12466>
23. Li, H., Liu, T., Sun, J., Zhao, S., Wang, X., Luo, W., Luo, R., Shen, W., Luo, C., & Fu, D. (2023). Up-Regulation of ProBDNF/P75NTR signaling in spinal cord drives inflammatory pain in male rats. *Journal of Inflammation Research*, Volume 16, 95–107. <https://doi.org/10.2147/jir.s387127>
24. Loeser, J. D., & Melzack, R. (1999). Pain: an overview. *The Lancet*, 353(9164), 1607–1609. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01311-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01311-2)
25. Massa, S. M., Xie, Y., Yang, T., Harrington, A., Kim, M. L., Yoon, S. O., Kraemer, R., Moore, L. A., Hempstead, B. L., & Longo, F. M. (2006). Small, Nonpeptide p75NTRLigands Induce Survival Signaling and Inhibit proNGF-Induced Death. *The Journal of Neuroscience*, 26(20), 5288–5300. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3547-05.2006>

26. McMahon S. B. (1996). NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 351(1338), 431–440. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0039>

27. Meabon, J. S., De Laat, R., Ieguchi, K., Wiley, J. C., Hudson, M. P., & Bothwell, M. (2015). LINGO-1 protein interacts with the p75 neurotrophin receptor in intracellular membrane compartments. *The Journal of biological chemistry*, 290(15), 9511–9520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608018>

28. Meeker, R. B., & Williams, K. S. (2014). Dynamic Nature of the p75 Neurotrophin Receptor in Response to Injury and Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 9(5), 615–628. <https://doi.org/10.1007/s11481-014-9566-9>

29. Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00048-3)

30. Nugraha, B., Gutenbrunner, C., Barke, A., Karst, M., Schiller, J., Schäfer, P., Falter, S., Korwisi, B., Rief, W., & Treede, R. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: functioning properties of chronic pain. *Pain*, 160(1), 88–94. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001433>

31. Obata, K., Katsura, H., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., & Noguchi, K. (2006). *Suppression of the p75 Neurotrophin Receptor in Uninjured Sensory Neurons Reduces Neuropathic Pain after Nerve Injury*. *Injury*. 26(46), 11974–11986. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3188-06.2006>

32. Obata, K., & Noguchi, K. (2006). BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neuroscience Research*, 55(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.01.005>

33. Pezet, S., & McMahon, S. B. (2006). NEUROTROPHINS: Mediators and Modulators of Pain. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 507–538.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929>

34. Pezet, S., Malcangio, M., Lever, I. J., Perkinson, M. S., Thompson, S. W., Williams, R. J., & McMahon, S. B. (2002). Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. *Molecular and cellular neurosciences*, 21(4), 684–695.
<https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1205>

35. Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361(1473), 1545–1564.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>

36. Scholz, J., Finnerup, N. B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K. D., Evers, S., First, M. B., Giamberardino, M. A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M. K., . . . Treede, R. (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>

37. Siniscalco, D., Giordano, C., Rossi, F., Maione, S., & De Novellis, V. (2011). Role of neurotrophins in neuropathic pain. *Current Neuropharmacology*, 9(4), 523–529.
<https://doi.org/10.2174/157015911798376208>

38. Snell, R.S. (2010). *Clinical Neuroanatomy*. Lippincott Williams & Wilkins.
<https://books.google.com.pr/books?id=ABPmvroyrD0C&printsec=copyrig ht#v=onepage&q&f=false>

39. Sun, L., Peng, C., Joosten, E. A., Cheung, C. W., Tan, F., Jiang, W., & Shen, X. (2021). Spinal cord stimulation and treatment of peripheral or central neuropathic pain: mechanisms and clinical application. *Neural Plasticity*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/5607898>

40. Tep, C., Lim, T. H., Ko, P. O., Getahun, S., Ryu, J. C., Goettl, V. M., Massa, S. M., Basso, M., Longo, F. M., & Yoon, S. O. (2013). Oral Administration of a Small Molecule Targeted to Block proNGF Binding to p75 Promotes Myelin Sparing and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, 33(2), 397–410. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0399-12.2013>

41. Terry, A. V., Kutiyanawalla, A., & Pillai, A. (2011). Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiology & Behavior*, 102(2), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.005>

42. Treede, R., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M. K., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S. A., . . . Wang, S. J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, 160(1), 19–27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>

43. Tracey W. D., Jr (2017). Nociception. *Current biology: CB*, 27(4), R129–R133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.037>

44. Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., . . . Wang, S. J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the

International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, 160(1), 19–27.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>

45. Treede, R., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M. K., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S. A., Smith, B. H., . . . Wang, S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, 156(6), 1003–1007.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000160>
46. Tsuda, M. (2015). Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(1), 17–26.
<https://doi.org/10.1111/jdi.12379>
47. Underwood, C. J., & Coulson, E. J. (2008). The p75 neurotrophin receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(9), 1664–1668. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.010>
48. Vader, K., Bostick, G. P., Carlesso, L. C., Hunter, J., Mesaroli, G., Perreault, K., Tousignant-Laflamme, Y., Tupper, S., Walton, D. M., Wideman, T. H., & Miller, J. (2021). The Revised IASP Definition of Pain and Accompanying Notes: Considerations for the Physiotherapy profession. *Physiotherapy Canada*, 73(2), 103–106.
<https://doi.org/10.3138/ptc-2020-0124-gee>
49. Volosin, M., Trotter, C., Cragolini, A. B., Kenchappa, R. S., Light, M., Hempstead, B. L., Carter, B. D., & Friedman, W. J. (2008). Induction of Proneurotrophins and Activation of p75NTR-Mediated Apoptosis via Neurotrophin Receptor-Interacting Factor in Hippocampal Neurons after Seizures. *The Journal of Neuroscience*, 28(39), 9870–9879.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2841-08.2008>

50. Wu, Y., Shen, Z., Xu, H., Zhang, K., Guo, M., Wang, F., & Li, J. (2021). BDNF participates in chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic pain via transcriptionally activating P2X7 in primary sensory neurons. *Molecular Neurobiology*, 58(9), 4226–4236. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02410-0>
51. Yang, T., Knowles, J. K., Lu, Q., Zhang, H., Arancio, O., Moore, L. A., Chang, T., Wang, Q., Andreasson, K., Rajadas, J., Fuller, G. G., Xie, Y., Massa, S. M., & Longo, F. M. (2008). Small molecule, non-peptide p75 ligands inhibit Abeta-induced neurodegeneration and synaptic impairment. *PloS one*, 3(11), e3604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003604>
52. Heuer J. G., Fatemie-Nainie S., Wheeler E. F., Bothwell M. (1990). Structure and developmental expression of the chicken NGF receptor. *Dev. Biol.* 137 287–304. 10.1016/0012-1606(90)90255-H
53. He, N., Qu, Y. J., Li, D. Y., & Yue, S. W. (2021). RIP3 Inhibition ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain by suppressing JNK signaling. *Aging*, 13(21), 24417–24431. <https://doi.org/10.18632/aging.203691>
54. 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>
55. Challa S. R. (2015). Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *The International journal of neuroscience*, 125(3), 170–174. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.922559>

56. Vega, J. A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., & Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. *Journal of anatomy*, 203(1), 1–19. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00203.x>
57. Bentley C. A., Lee K.-F. (2000). p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J. Neurosci.* 20 7706–7715. 10.1523/JNEUROSCI.20-20-07706.2000
58. Alles, S. R. A., & Smith, P. A. (2018). Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacological reviews*, 70(2), 315–347. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014399>
59. Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences*, 35(4), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.003>
60. Bergmann, I., Priestley, J. V., McMahon, S. B., Bröcker, E. B., Toyka, K. V., & Koltzenburg, M. (1997). Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *The European journal of neuroscience*, 9(1), 18–28. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01349.x>
61. Zhang, Y. H., Khanna, R., & Nicol, G. D. (2013). Nerve growth factor/p75 neurotrophin receptor-mediated sensitization of rat sensory neurons depends on membrane cholesterol. *Neuroscience*, 248, 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.039>
62. Song, X. Y., Zhou, F. H., Zhong, J. H., Wu, L. L., & Zhou, X. F. (2006). Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *Journal of neurochemistry*, 96(3), 833–842. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03564.x>

63. V. Maritza Velasco. (2014). Dolor neuropático. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(4), 625–634. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70083-5](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70083-5)
64. Espinoza MA, Bilbeny N, Abbott T, Carcamo C, Zitko P, Zamorano P, Balmaceda C. Cost analysis of chronic pain due to musculoskeletal disorders in Chile. *PLoS One*. 2022 Oct 27;17(10):e0273667. doi: 10.1371/journal.pone.0273667. PMID: 36301984; PMCID: PMC9612497
65. Petroianu, G. A., Aloum, L., & Adem, A. (2023). Neuropathic pain: Mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1072629. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1072629>
66. Bannister, K., Sachau, J., Baron, R., & Dickenson, A. H. (2020). Neuropathic Pain: Mechanism-Based Therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 60, 257–274. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021524>
67. De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P., & Eckel, G. (2004). Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *European journal of pharmacology*, 491(2-3), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.03.051>
68. Gopalsamy, B., Sambasevam, Y., Zulazmi, N. A., Chia, J. S. M., Omar Farouk, A. A., Sulaiman, M. R., Tengku Mohamad, T. A. S., & Perimal, E. K. (2019). Experimental Characterization of the Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain Model in Mice. *Neurochemical research*, 44(9), 2123–2138. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02850-0>
69. Bennett, G. J., & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1), 87–107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)

70. Wang, C., Chen, P., Lin, D., Chen, Y., Lv, B., Zheng, K., Lin, X., & Wu, Z. (2021). Effects of varying degrees of ligation in a neuropathic pain model induced by chronic constriction injury. *Life sciences*, 276, 119441. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119441>
71. Hu, P., Bembrick, A. L., Keay, K. A., & McLachlan, E. M. (2007). Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain, behavior, and immunity*, 21(5), 599–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.013>
72. Wilson-Gerwing, T. D., Stucky, C. L., McComb, G. W., & Verge, V. M. (2008). Neurotrophin-3 significantly reduces sodium channel expression linked to neuropathic pain states. *Experimental neurology*, 213(2), 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.06.002>
73. Leong, M. L., Speltz, R., & Wessendorf, M. (2016). Effects of chronic constriction injury and spared nerve injury, two models of neuropathic pain, on the numbers of neurons and glia in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience letters*, 617, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.006>
74. Medeiros, P., de Freitas, R. L., Boccella, S., Iannotta, M., Belardo, C., Mazzitelli, M., Romano, R., De Gregorio, D., Coimbra, N. C., Palazzo, E., & Maione, S. (2020). Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice. *Journal of neuroscience research*, 98(2), 338–352. <https://doi.org/10.1002/jnr.24501>
75. Cao, T., Matyas, J. J., Renn, C. L., Faden, A. I., Dorsey, S. G., & Wu, J. (2020). Function and Mechanisms of Truncated BDNF Receptor TrkB.T1 in Neuropathic Pain. *Cells*, 9(5), 1194. <https://doi.org/10.3390/cells9051194>

76. Chen SH, Wu CC, Lin SC, Tseng WL, Huang TC, Yadav A, Lu FI, Liu YH, Lin SP, Hsueh YY. Investigation of Neuropathology after Nerve Release in Chronic Constriction Injury of Rat Sciatic Nerve. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 29;22(9):4746. doi: 10.3390/ijms22094746. PMID: 33947104; PMCID: PMC8125611.
77. Kuner, R., & Flor, H. (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nature reviews. Neuroscience*, 18(1), 20–30. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.162>
78. Hirose, M., Kuroda, Y., & Murata, E. (2016). NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 16(2), 175–182. <https://doi.org/10.1111/papr.12342>
79. Norman, B. H., & McDermott, J. S. (2017). Targeting the Nerve Growth Factor (NGF) Pathway in Drug Discovery. Potential Applications to New Therapies for Chronic Pain. *Journal of medicinal chemistry*, 60(1), 66–88. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00964>
80. Delcroix, J. D., Valletta, J. S., Wu, C., Hunt, S. J., Kowal, A. S., & Mobley, W. C. (2003). NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron*, 39(1), 69–84. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00397-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00397-0)
81. Pak, D. J., Yong, R. J., Kaye, A. D., & Urman, R. D. (2018). Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications. *Current pain and headache reports*, 22(2), 9. <https://doi.org/10.1007/s11916-018-0666-8>
82. Dechant, G., & Barde, Y. A. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous

system. *Nature neuroscience*, 5(11), 1131–1136.
<https://doi.org/10.1038/nn1102-1131>

83. Bennett, G. J., & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1), 87–107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)
84. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017 Sep 6;10:284. doi: 10.3389/fnmol.2017.00284. PMID: 28932184; PMCID: PMC5592204.
85. Wu, X., Yoo, S., & Wrathall, J. R. (2005). Real-time quantitative PCR analysis of temporal–spatial alterations in gene expression after spinal cord contusion. *Journal of Neurochemistry*, 93(4), 943–952. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03078.x>
86. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
87. Ginty, D. D., & Segal, R. A. (2002). Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Current opinion in neurobiology*, 12(3), 268–274. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(02\)00326-4](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00326-4)
88. Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 30(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
89. Terada, Y., Morita-Takemura, S., Isonishi, A., Tanaka, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Shinjo, T., Kawaguchi, M., & Wanaka, A. (2018). NGF and BDNF expression in mouse DRG after spared nerve injury. *Neuroscience letters*, 686, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.051>

90. Barker, P. A., Mantyh, P., Arendt-Nielsen, L., Viktrup, L., & Tive, L. (2020). Nerve Growth Factor Signaling and Its Contribution to Pain. *Journal of pain research*, 13, 1223–1241. <https://doi.org/10.2147/JPR.S247472>
91. Li, C. Q., Xu, J. M., Liu, D., Zhang, J. Y., & Dai, R. P. (2008). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to the pain hypersensitivity following surgical incision in the rats. *Molecular pain*, 4, 27. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-27>
92. Nijs, J., Meeus, M., Versijpt, J., Moens, M., Bos, I., Knaepen, K., & Meeusen, R. (2015). Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target?. *Expert opinion on therapeutic targets*, 19(4), 565–576. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.994506>
93. Narita, M., Yajima, Y., Aoki, T., Ozaki, S., Mizoguchi, H., Tseng, L. F., & Suzuki, T. (2000). Up-regulation of the TrkB receptor in mice injured by the partial ligation of the sciatic nerve. *European journal of pharmacology*, 401(2), 187–190. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00449-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00449-0)
94. Bergmann, I., Priestley, J. V., McMahon, S. B., Bröcker, E. B., Toyka, K. V., & Koltzenburg, M. (1997). Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *The European journal of neuroscience*, 9(1), 18–28. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01349.x>
95. Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual review of immunology*, 32, 367–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>

96. 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>
97. 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>
98. Raghavendra, V., Tanga, F., & DeLeo, J. A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306(2), 624–630. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052407>
99. Boakye PA, Tang SJ, Smith PA. Mediators of Neuropathic Pain; Focus on Spinal Microglia, CSF-1, BDNF, CCL21, TNF- α , Wnt Ligands, and Interleukin 1 β . *Front Pain Res (Lausanne)*. 2021 Aug 25;2:698157. doi: 10.3389/fpain.2021.698157. PMID: 35295524; PMCID: PMC8915739.
100. Zhen, W., Zhen, H., Wang, Y., Chen, L., Niu, X., Zhang, B., Yang, Z., & Peng, D. (2023). Mechanism of ERK/CREB pathway in pain and analgesia. *Frontiers in molecular neuroscience*, 16, 1156674. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1156674>
101. Zhuang, Z. Y., Gerner, P., Woolf, C. J., & Ji, R. R. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*, 114(1-2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.022>
102. Zhuang, Z. Y., Wen, Y. R., Zhang, D. R., Borsello, T., Bonny, C., Strichartz, G. R., Decosterd, I., & Ji, R. R. (2006). A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory

neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(13), 3551–3560. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5290-05.2006>

103. Yang, Y., Wen, J., Zheng, B., Wu, S., Mao, Q., Liang, L., Li, Z., Bachmann, T., Bekker, A., & Tao, Y. X. (2021). CREB Participates in Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain Genesis Through Transcriptional Activation of Dnmt3a in Primary Sensory Neurons. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 18(1), 586–600. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00931-5>
104. Shu, X. Q., & Mendell, L. M. (1999). Neurotrophins and hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7693–7696. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7693>