



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

MODULACIÓN METABÓLICA EN MODELOS DE DOLOR CRÓNICO

Lic. Valentina Lagos Rodríguez

Orientadora: Dra. Patricia Cassina

Co-orientadora: Dra. Natalia Lago

Comisión de Asesoramiento y Seguimiento:

Dra. Giselle Prunell

Dra. Nathalia Vitoreira

Dra. Mónica Brauer

Tribunal:

Dra. Nathalia Vitoreira (Presidente)

Dr. Raúl Russo (Vocal)

Dra. Giselle Prunell (Vocal)

Unidad Académica de Histología y Embriología

Facultad de Medicina

Universidad de la República

Diciembre 2024

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Patricia Cassina y Natalia Lago, orientadoras de esta tesis, por la paciencia, la confianza, el inmenso apoyo y todo lo aprendido. Su guía y conocimiento han sido clave en mi crecimiento durante estos años.

Al Dr. Stephen McMahon (1954 - 2021) por su inmenso aporte a la ciencia del dolor y por inspirar este trabajo.

A la Dra. Nathalia Vitureira, el Dr. Raúl Russo y la Dra. Giselle Prunell por acceder a ser parte del tribunal de esta tesis.

A la Dra. Adriana Cassina, por su apoyo y conocimiento.

Al Dr. Javier Nogueira por su apoyo y compromiso con este trabajo, así como por su contagioso entusiasmo.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular. De una u otra manera todos aportaron para que pudiera terminar esta etapa y los trabajos que formaron parte de esta tesis. En especial al Dr. Ernesto Miquel, la Dra. Laura Martínez por su amistad. Así como a la Dra. Patricia Cassina, directora del laboratorio, por hacer de este grupo un entorno de gran calidad humana, donde realmente es un placer trabajar.

A todos los compañeros que forman o han formado parte de la Unidad Académica de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina, donde pude realizar gran parte de los experimentos de este trabajo.

A Alexandra Elbakyan, por su trabajo para eliminar barreras de acceso al conocimiento científico.

A los integrantes de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) y a la Lic. Mariana Di Doménico de la Unidad de Microscopía Confocal y Epifluorescencia de la Facultad de Medicina (UMCE) por la buena disposición.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República (CAP) por el apoyo económico durante mi doctorado. Así como a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, por la financiación de los proyectos que formaron parte de este trabajo.

Al Lic. Rodrigo Yarzabal y el Lic. Marcelo Lagos, por su contagioso entusiasmo, por considerar la importancia de la ciencia básica y por sumarme al equipo en formación para la enseñanza y el abordaje terapéutico del dolor crónico.

A la Lic. Carla Viscaino por el espacio, apoyo y contención

A mis amigas y amigos por su incondicional apoyo y su constante aliento, sin los cuales habría sido muy mucho más difícil terminar esta etapa.

A Marcelo, mi hermano, por creer siempre en mí. Por ofrecerme una perspectiva clínica y ayudarme a comprender la problemática de los pacientes, así como por su trabajo y dedicación como fisioterapeuta, para mejorar la calidad de vida de quienes sufren de dolor crónico.

Dedico y agradezco:

A mi mamá y a mi papá, Lilián y Ruben, que nunca tuvieron ni un atisbo de duda en que yo podía. Les agradezco por el infinito amor y dedicación que nos brindaron. Por todo el sacrificio que hicieron para que saliéramos adelante y pudiéramos estudiar. Por alimentar mi curiosidad, mi capacidad de asombro y mi amor por la biología. Porque me enseñaron y me ayudaron a cumplir mis sueños, en particular el que tuve desde los 7 años: ser científica.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
Dolor crónico: relevancia y abordaje terapéutico.....	14
Modelos preclínicos de dolor crónico.....	17
Mecanismos neurobiológicos del dolor.....	18
Sustratos neuroanatómicos.....	18
Mecanismos celulares y moleculares del dolor agudo.....	22
Sensibilización Periférica.....	24
Sensibilización Central.....	25
Matriz extracelular y neuroplasticidad.....	30
Células gliales y dolor.....	31
Células gliales.....	31
Astrocitos.....	31
Microglía.....	32
Mitocondria y dolor.....	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
Hipótesis.....	46
Objetivo general.....	46
Objetivos específicos.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
Animales.....	47
Inyección plantar de adyuvante completo de Freund.....	47
Constricción crónica de nervio ciático.....	48
Administración de dicloroacetato.....	48

Evaluación sensorial.....	49
Test de algiesimetría térmica.....	49
Test de algiesimetría mecánica.....	50
Evaluación del edema y peso corporal tras la inyección de adyuvante completo de Freud.....	51
Respirometría de alta resolución.....	52
Procesamiento para inmunofluorescencia.....	54
Obtención y análisis de imágenes.....	55
Procesamiento de muestras para western blot.....	60
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....	61
Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	63
RESULTADOS.....	64
CAPÍTULO I: Estudio de la actividad respiratoria mitocondrial en la médula espinal de modelos de dolor crónico y su modulación metabólica por dicloroacetato.....	64
1) Establecimiento y caracterización de los modelos de dolor crónico.....	64
2) Curso temporal de la reactividad glial en animales con inyección de adyuvante completo de freud y constricción crónica del nervio ciático.....	68
3) Análisis de la función respiratoria mitocondrial en la médula espinal lumbar de animales con lesiones que provocan dolor crónico.....	71
4) Evaluación del tratamiento con dicloroacetato en la actividad de la PDH a nivel de la médula espinal.....	74
5) Efecto de la modulación metabólica con dicloroacetato sobre la función respiratoria mitocondrial en la médula espinal de animales con lesiones que inducen dolor crónico.....	76
6) Efecto de la estimulación mitocondrial con dicloroacetato sobre la hiperalgesia y alodinia de animales con lesiones que inducen dolor crónico.....	77
7) Efecto de la administración oral de dicloroacetato sobre el edema local y el peso corporal de animales con lesiones que inducen dolor inflamatorio.....	80
8) Impacto del dicloroacetato sobre la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal de animales con lesiones que provocan dolor crónico.....	81
9) Efecto del dicloroacetato sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en la médula espinal de animales con lesiones asociadas a dolor crónico.....	84

CAPÍTULO II: Análisis morfológico de la neuroplasticidad en el asta dorsal de la médula espinal de animales con dolor neuropático y sus modificaciones frente al tratamiento con dicloroacetato.....	86
1) Análisis de la matriz extracelular en la médula espinal de animales con dolor neuropático y su modulación por dicloroacetato.....	86
2) Expresión de marcadores de sinapsis inhibitoras en el asta dorsal de la médula espinal de animales con dolor neuropático y su modulación con dicloroacetato.....	89
3) Expresión de marcadores de sinapsis exitadoras en el asta dorsal de la médula espinal de animales con dolor neuropático y su modulación con dicloroacetato.....	91
DISCUSIÓN.....	99
Función respiratoria mitocondrial en contextos de dolor crónico.....	99
Modulación metabólica como estrategia para la reducción de la hipersensibilización al dolor.....	102
Efecto del dicloroacetato sobre la sensibilización central de la médula espinal.....	105
¿Existe una relación entre la reactividad glial y las modificaciones sinápticas?.....	109
CONCLUSIONES.....	111
PERSPECTIVAS.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	114
ANEXO: PUBLICACIÓN.....	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conexiones entre las fibras aferentes primarias y la médula espinal.....	20
Figura 2. Anatomía de la vía del dolor.....	22
Figura 3. Participación de los procesos neuroinflamatorios periféricos y centrales en el dolor crónico.....	29
Figura 4. Sensibilización central local y remota inducida por la activación glial y la neuroinflamación en la médula espinal.....	36
Figura 5. Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial y del sistema de fosforilación oxidativa.....	40
Figura 6. Sitio de acción del dicloroacetato.....	44
Figura 7. Diseño del trabajo experimental.....	49
Figura 8. Medición del volumen de la extremidad posterior.....	52
Figura 9. Análisis por respirometría de alta resolución.....	53
Figura 10. Regiones del asta dorsal de la médula espinal adquiridas con microscopía de epifluorescencia.....	56
Figura 11. Diagrama del procesamiento de imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias de los marcadores pre y postsinápticos glutamatérgicos mediante un macro desarrollado en el software FIJI.....	58
Figura 12. Diagrama del procesamiento de imágenes para el análisis de contactos VGLUT2-PSD95.....	59
Figura 13. Comportamiento relacionado con el dolor en animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	65
Figura 14. Curso temporal de los cambios de volumen de las patas posteriores y el peso corporal en animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	66
Figura 15. Comportamiento relacionado con el dolor en animales con constricción crónica del nervio ciático.....	67
Figura 16. Curso temporal de la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	69
Figura 17. Curso temporal de la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal de animales con constricción crónica del nervio ciático.....	70
Figura 18. Respirometría de alta resolución en hemimédulas de animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	72
Figura 19. Respirometría de alta resolución en médulas de animales con constricción crónica del nervio ciático.....	73

Figura 20. Disminución de los niveles de pPDH en muestras de la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud tratados con dicloroacetato.....	74
Figura 21. Disminución de los niveles de pPDH en la médula espinal de animales con constricción crónica del nervio ciático tratados con dicloroacetato.....	75
Figura 22. El tratamiento con dicloroacetato aumentó los parámetros bioenergéticos mitocondriales que se habían reducido en la hemimédula espinal ipsilateral a la inyección de adyuvante completo de Freud.....	76
Figura 23. El tratamiento con dicloroacetato aumentó los parámetros bioenergéticos mitocondriales que se habían reducido en la médula espinal de los animales con contricción crónica del nervio ciático bilateral.....	77
Figura 24. El dicloroacetato redujo la latencia y el umbral de retirada de la extremidad dañada en animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	78
Figura 25. El dicloroacetato redujo la latencia de retirada de la extremidad lesionada en animales con contricción crónica del nervio ciático.....	79
Figura 26. El dicloroacetato no modifica el edema de la extremidad posterior inyectada, pero si el peso corporal de los animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	80
Figura 27. El dicloroacetato redujo la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1 en la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	82
Figura 28. El dicloroacetato redujo la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1 en la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático.....	83
Figura 29. El tratamiento con dicloroacetato no modificó la expresión de ARNm de IL-1 β y TNF- α en la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud.....	84
Figura 30. El tratamiento con dicloroacetato no modificó la expresión de ARNm de IL-1 β y TNF- α en la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático.....	85
Figura 31. La expresión de agregano disminuyó en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático, lo cual se previno con la administración de dicloroacetato.....	88
Figura 32. La expresión de la enzima GAD67 disminuyó en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático, y se revirtió tras el tratamiento con dicloroacetato.....	90
Figura 33. Los niveles de expresión de VGLUT2 y PSD95 aumentaron en la médula espinal ipsilateral tras la lesión por contricción crónica del nervio ciático.....	92

Figura 34. El dicloroacetato revirtió el aumento en la expresión de VGLUT2 y PSD95 en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático.....	94
Figura 35. El dicloroacetato previno el aumento de la intensidad de fluorescencia medida y el volumen de las partículas VGLUT2 y PSD95 en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático.....	96
Figura 36. El dicloroacetato reduce el número de contactos VGLUT2-PSD95, al igual que la intensidad de fluorescencia media y el volumen de las partículas involucradas, en el sitio ipsilateral a la lesión de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF - Adyuvante completo de Freund

ADP - Adenosín difosfato (*Adenosine diphosphate*)

AMPA - Acido-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (*α - amino -3 - hydroxy - 5- methyl - 4 - isoxazolepropionic acid*)

Apaf 1 - Factor activador de proteasa de apoptosis-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*)

ATP - Adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*)

BDNF - Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)

cAMP - Adenosín monofosfato cíclico (*Cyclic adenosine monophosphate*)

CCI - Constricción crónica del nervio ciático (*Chronic constriction injury*)

CGRP- Gen de la calcitonina (*Calcitonin gene related peptide*)

CREB - Factor de transcripción de unión al elemento de respuesta AMPc (*cAMP response element-binding*)

CRGP - Gen de la calcitonina (*Calcitonin gene-related peptide*)

DAMPs - Patrones moleculares asociados a daños (*Damage-associated molecular pattern*)

DCA - Dicloroacetato

Dpi - Días post inyección

Dpl - Días post lesión

ELA - Esclerosis Lateral Amiotrófica

EPSC - Corrientes postsinápticas excitadoras (*Excitatory postsynaptic potential*)

ERK- Quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular - Signal - Regulated Kinase*)

ERONs - Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

FADH₂ - Flavín adenín dinucleótido

FCCP - Carbonil-cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (*Carbonyl-cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine*)

FGF- β - Factor de crecimiento de fibroblastos básico (*Basic fibroblast growth factor*)

GABA - Ácido gamma-aminobutírico (*Gamma-aminobutyric acid*)

GAD - Glutamato descarboxilasa (*Glutamic acid decarboxylase*)

GAT - Transportadores de GABA (*GABA transporters*)

GBD - Carga Global de Enfermedades (*Global Burden of Disease*)

GFAP - Proteína ácida glial fibrilar (*Glial fibrillary acidic protein*)

GLAST - Transportador glutamato-aspartato (*Glutamate-aspartate transporter*)

GLT1 - Transportador glutamato-1 (*Glutamate transporter-1*)

GlyT2 - Transportador de glicina (*Glycine transporter 2*)

GPX - Glutación peroxidasa

GTP - Guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*)

HIF-1 α - Factor inducido por hipoxia -1 α (*Hypoxia Inducible Factor*)

IASP - Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (*International Association for the Study of Pain*)

Iba-1 - Molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*)

ICD-11 - Clasificación Internacional de Enfermedades (*International Classification of Diseases*)

IL-1 β - Interleuquina-1 β (*Interleukin-1 β*)

IP3 - Inositol trifosfato (*Inositol trisphosphate*)

ISI - Índice de gravedad del insomnio

JNKs - Cinasas c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinase*)

KAR - Kainato (*Kainic acid receptor*)

MAPK - Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinases*)

MEC - Matriz extracelular

MitoQ - Mitoquinona

MME - Membrana mitocondrial externa

MMI - Membrana mitocondrial interna

MMP-9 - Metaloproteínasa de matriz 9 (*Matrix metalloproteinase-9*)

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido

NMDA - N-metil-D-aspartato (*N-methyl-D-aspartate*)

nNOS - Óxido nítrico sintasa neuronal (*Neuronal nitric oxide synthase*)

NO - Óxido nítrico

NRG1 - Neuregulina 1

PDC – Complejo piruvato deshidrogenasa (*Pyruvate dehydrogenase complex*)

PDH - Piruvato deshidrogenasa

PDK - Piruvato deshidrogenasa quinasa (*Pyruvate dehydrogenase kinase*)

Pfkfb3 - 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3
(*6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3*)

Prx - Peroxirredoxinas

PSD95 - Proteínas de densidad postsináptica (*Post-synaptic density protein*)

pSNL - Ligadura parcial del nervio ciático (*Partial ligation of the sciatic nerve*)

PSQI - Índice de calidad del sueño de Pittsburgh

RPN - Redes perineuronales

SIN - Ligadura neural por omisión (*Spared nerve injury*)

SNC - Sistema nervioso central

SNL - Ligadura del nervio espinal (*Spinal nerve ligation*)

SODs - Superóxido dismutasa

TNF- α - Factor de necrosis tumoral α (*Tumor necrosis factor α*)

TRP - Receptor de Potencial Transitorio (*Transient Receptor Potential*)

UMCE - Unidad de Microscopía Confocal y Epifluorescencia de la Facultad de Medicina

VGAT - Transportador vesicular GABA (*Vesicular GABA Transporter*)

VGLUT - Transportador vesicular de glutamato (*Vesicular glutamate transporter*)

$\Delta\mu\text{H}$ - Potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada con un daño tisular real o potencial. Se considera crónico cuando se prolonga durante más de tres a seis meses, o si persiste cuando ha desaparecido la causa y se considera que debiera haber remitido. Actualmente, esta patología representa un problema clínico de gran impacto social y económico en la población mundial, con pocas estrategias farmacológicas eficaces. Por esto, resulta de suma importancia el estudio de los mecanismos involucrados y de posibles estrategias terapéuticas.

Los mecanismos neurobiológicos propuestos incluyen la sensibilización periférica de los nociceptores, mediada por factores inflamatorios liberados por las células inmunes, y la sensibilización central a nivel de las sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal. La reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal es una característica distintiva en la mayoría de las afecciones con dolor crónico. Se ha demostrado que la reactividad glial asociada a la degeneración de motoneuronas, particularmente en los astrocitos, se acompaña de una reducción en la función respiratoria mitocondrial. En este trabajo, estudiamos la función respiratoria mitocondrial mediante respirometría de alta resolución en la médula espinal lumbar de animales con inyección de adyuvante completo de Freund en la extremidad posterior, como modelo de dolor inflamatorio, y con constricción crónica del nervio ciático, como modelo de dolor neuropático. En ambos modelos, encontramos una disminución significativa en los parámetros bioenergéticos mitocondriales a nivel de la médula espinal relacionada con la lesión. Esto coincidió con un aumento en la reactividad de astrocitos y microglía. La administración oral de dicloroacetato, un modulador metabólico que estimula la fosforilación oxidativa por inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa, aumentó significativamente la función respiratoria mitocondrial. Asimismo, este tratamiento disminuyó la inmunorreactividad para los marcadores gliales de astrocitos, la proteína ácida glial fibrilar (Glial fibrillary acidic protein, GFAP), y de microglía, la molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba-1). De manera notable, también se observó una reducción significativa de la hipersensibilidad al dolor en la extremidad afectada, sin alterar la sensibilidad en la extremidad contralateral en ambos modelos de dolor.

Con el objetivo de caracterizar mejor el efecto de la modulación metabólica, evaluamos la relación entre la función respiratoria mitocondrial y la neuroplasticidad que ocurre en la médula espinal, y que es responsable de la sensibilización central, utilizando un abordaje estructural con inmunofluorescencia. De esta forma, estudiamos la expresión de un

componente de la matriz extracelular (MEC) y de marcadores sinápticos excitadoras e inhibitorios en el asta dorsal de la médula espinal.

En nuestro estudio, observamos una disminución significativa en uno de los componentes de la MEC, agrecano, restringida al asta dorsal ipsilateral a la lesión. Esta disminución fue revertida tras el tratamiento con dicloroacetato. En la sensibilización central se observa un aumento en la expresión de los marcadores de sinapsis glutamatérgicas, la proteína de densidad postsináptica (*Post-synaptic density protein*, PSD95) y del transportador vesicular de glutamato 2 (*Vesicular glutamate transporter 2*, VGLUT2) y una disminución de marcadores de sinapsis GABAérgicas, la enzima glutamato decarboxilasa (*Glutamic acid decarboxylase*, GAD), en la médula espinal de los animales lesionados. El tratamiento con dicloroacetato (DCA) redujo los niveles de expresión de VGLUT2 y PSD95 al nivel del asta contralateral, en particular los puntos de contacto entre ambos marcadores. Además, se observó un incremento en la inmunorreactividad del marcador de componentes presinápticos inhibitorios GAD67 en la médula espinal de los animales lesionados. Nuestros resultados nos permiten afirmar que durante el dolor crónico, la reactividad glial se asocia a una disminución en la función respiratoria mitocondrial, la cual induce alteraciones en la neuroplasticidad a nivel de la médula espinal. Estos cambios subyacen a los fenómenos de hiperalgesia y alodinia identificados en los modelos experimentales utilizados. Por lo tanto, proponemos que la modulación metabólica puede ofrecer una terapia alternativa para situaciones de dolor crónico.

INTRODUCCIÓN

DOLOR CRÓNICO: RELEVANCIA Y ABORDAJE TERAPÉUTICO

El dolor es un síntoma que se asocia a múltiples patologías y es la causa más frecuente de las consultas médicas. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (*International Association for the Study of Pain*, IASP) define al dolor como "una experiencia sensorial y emocional desagradable vinculada o similar a la asociada con un daño tisular real o potencial" [1]. Esta definición reconoce que el dolor puede ocurrir en ausencia de daño tisular identificable.

Evolutivamente, el dolor tiene una función protectora, dado que frente a un estímulo nociceptivo (potencialmente dañino), alerta de un daño que debe de ser evitado o tratado. La sensibilidad a los estímulos, la percepción de dolor, o algesia, puede presentar alteraciones que se conocen como hiperalgesia y alodinia. La hiperalgesia se define como el aumento de la sensibilidad dolorosa frente a estímulos nociceptivos y un menor umbral para su percepción; la alodinia es la percepción de dolor frente a estímulos no nociceptivos, pudiendo además presentarse el dolor espontáneo, que ocurre en ausencia de estímulos externos [2]. El dolor puede clasificarse como agudo y crónico. A diferencia del dolor agudo, que tiene un valor biológico adaptativo, el dolor crónico es aquél que se prolonga durante más de tres a seis meses, o que persiste cuando la causa ha desaparecido y se considera que debiera haber remitido [3].

El dolor crónico es un síntoma asociado a injurias directas e indirectas del sistema nervioso, afectando la calidad de vida de pacientes que cursan otras patologías tales como diabetes, enfermedades neurodegenerativas o cáncer. Sin embargo, se reconoce como una entidad patológica en sí misma [4], caracterizado como enfermedad por la Clasificación Internacional de Enfermedades (*International Classification of Diseases*, ICD-11) [5].

De acuerdo a los mecanismos biológicos involucrados, el dolor crónico puede clasificarse en nociceptivo, neuropático y nociplástico [6].

El dolor nociceptivo es aquel que surge de un daño real o potencial a tejidos no nerviosos (fractura ósea, artrosis, etc.), y se debe a la activación de los nociceptores [6]. La alodinia mecánica e hipersensibilidad térmica que genera están relacionadas con mediadores

inflamatorios, y otras señales químicas liberadas desde los tejidos lesionados, que alteran el umbral de los nociceptores y la excitabilidad de las neuronas de la médula [7], [8].

El dolor neuropático se define como el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial, tanto central como periférico [6]. En comparación con el dolor nociceptivo, además de la alodinia e hiperalgesia, el dolor neuropático se asocia típicamente con anomalías sensoriales, como entumecimiento, dolor espontáneo, sensación quemante y paroxismos de dolor más prominentes, según los nervios afectados. Los descriptores típicos del dolor nociceptivo incluyen términos como doloroso y punzante, mientras que el dolor neuropático generalmente se describe con adjetivos como lancinante y punzante [9]. Las afecciones más comunes de dolor neuropático incluyen las radiculopatías, la neuralgia del trigémino, la neuropatía diabética, la neuralgia postherpética, el dolor neuropático inducido por radiación y quimioterapia, y el dolor post-accidente cardiovascular, entre otros [10]. Aunque el grado de asociación entre la intensidad del dolor y la discapacidad, en comparación con el dolor nociceptivo es similar, el dolor neuropático podría estar asociado a una mayor disminución de la calidad de vida [11], [12].

En cuanto al dolor neoplásico, es aquel que surge de una nocicepción alterada a pesar de no haber evidencia clara de daño tisular, real o posible, que cause la activación de nociceptores periféricos, o evidencia de enfermedades o lesiones del sistema somatosensorial que desencadenen el dolor [6]. Los mecanismos fisiopatológicos que causan estos trastornos implican principalmente un aumento del procesamiento sensorial y una disminución de las vías inhibitorias [13].

El dolor crónico es considerado un problema grave y creciente de salud pública a nivel mundial por su alta frecuencia, por el estrés físico y emocional que genera, y por el alto costo económico y social que significa en los servicios de salud y en ausentismo laboral [14], [15], [16].

Los informes más recientes de estimaciones del estudio “Carga Global de Enfermedades” (*Global Burden of Disease*, GBD), indican que tres trastornos musculoesqueléticos caracterizados por dolor crónico (lumbalgia, dolor de cuello y osteoartritis) fueron las principales causas de morbilidad y discapacidad en todo el mundo, con aumentos recientes tanto en el número de personas afectadas como en los años perdidos por discapacidad [5]. Se estima que el dolor crónico afecta entre un 20% a 40% de la población mundial, indicando que aproximadamente 1 de cada 5 adultos padecen de algún tipo de dolor crónico [14]. A pesar de estas estadísticas, los datos sobre su magnitud y distribución en los países en vías de desarrollo son escasos. En América Latina, la mayoría de los estudios provienen de Brasil [17], [18], [19], con muy poca información disponible de otros países

latinoamericanos [20], [21]. Una revisión sistemática que incluyó 35 estudios de investigación que cubrieron todo el territorio brasileño, indicó que la prevalencia del dolor crónico en este país osciló entre 23,02 y 76,17%, de una muestra de 122.060 personas con edades entre 15 y 80 años [22]. En lo que respecta a Uruguay, nuestro país no cuenta con registros del Ministerio de Salud Pública de la prevalencia del dolor crónico. A pesar de esto, se han desarrollado estudios incipientes, pero no menores, restringidos a los usuarios de La Unidad Interdisciplinaria de Dolor del Hospital Maciel - Banco de Seguros del Estado, unidad que comenzó a funcionar en el año 2019 [23]. El conjunto de resultados de todos estos estudios, a nivel mundial y local, muestran la similitud de la prevalencia del dolor crónico entre países desarrollados y en vías de desarrollo, a pesar de las diferencias en el acervo genético, ambiental y cultural entre estos países.

A pesar de los esfuerzos de los equipos multidisciplinarios y de los avances en la comprensión de los mecanismos subyacentes al dolor, los tratamientos actualmente disponibles sólo logran mejoras moderadas en el funcionamiento físico y emocional, y mínimas en la percepción de la intensidad del dolor [23], [24]. Los tratamientos farmacológicos más frecuentes para el dolor crónico se basan en el uso de opioides y gabapentinoides [25], [26]. Los opioides, tales como la codeína, fentanilo, metadona, morfina, oxicodona o el tramadol, son fármacos que se unen a los receptores del sistema opioide endógeno actuando como agonistas, controlando así las respuestas nociceptivas [27]. A pesar de ser los fármacos más empleados, el consumo de opioides trae aparejado un extenso espectro de efectos adversos que incluyen estreñimiento, náuseas, vómitos, sedación, mareos, hipotensión, mayor riesgo de convulsiones, sudoración y estados de ánimos de disforia y euforia [28]. Además, los opioides pueden provocar reacciones de mayor riesgo como cambios hemodinámicos, riesgos de insuficiencia suprarrenal, trastornos cardiovasculares, inmunosupresión, toxicidad por serotonina y depresión respiratoria [29]. Sumado a esto, su administración prolongada puede provocar el desarrollo de tolerancia a los analgésicos, dependencia, conductas de abuso y síntomas de abstinencia [30]. Por su parte, los gabapentinoides (gabapentina y pregabalina) son análogos del neurotransmisor inhibidor ácido gamma-aminobutírico (*Gamma-aminobutyric acid*, GABA), y aumentan el tono GABAérgico sin tener efectos directos sobre el receptor GABA [31]. El perfil de los efectos adversos de los gabapentinoides no mejora al de los opioides, pudiendo producir mareos, somnolencia, efectos gastrointestinales, alteraciones cardíacas, depresión respiratoria, entre otros, y al igual que los opioides, pueden producir dependencia, abuso y síndrome de abstinencia [26]. Además de los considerables efectos adversos que traen consigo los opioides y los gabapentinoides, su eficacia es limitada [32], [33].

La compleja naturaleza del dolor crónico, su prevalencia a nivel mundial, el impacto socioeconómico que tiene, sumado al hecho de que la poca medicación disponible para su tratamiento es de eficacia limitada y provoca efectos adversos, demanda aumentar los esfuerzos para desentrañar los mecanismos neurobiológicos que le subyacen con el fin de obtener nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento.

MODELOS PRECLÍNICOS DE DOLOR CRÓNICO

El ritmo de avance en la comprensión del dolor se ha acelerado enormemente por el desarrollo de modelos animales de experimentación (fundamentalmente en rata y ratón) que reflejan algún elemento de los síndromes clínicos del dolor [34]. Existen numerosos protocolos para el estudio del dolor persistente o crónico, que incluyen modelos de dolor superficial, articular, muscular, postquirúrgico, orofacial, tumoral, entre otros. Los mecanismos patológicos involucrados son fundamentalmente de tipo inflamatorio y neuropático, o en algunos casos involucran ambos [34], [35].

En los modelos de dolor inflamatorio, el dolor es inducido por la inyección (en general en uno de los miembros posteriores) de diversos agentes que provocan inflamación en el sitio de inyección, tales como formalina, carragenina, o adyuvante completo de Freund (ACF) [36], [37], [38]. Cada agente inflamatorio produce un curso temporal único de respuestas al dolor que dura desde minutos (formalina) e incluso hasta semanas (ACF), lo que permite estudios a corto o largo plazo [39].

El modelo de inyección intraplantar de ACF fue descrito por Stein et al., 1988 buscando una estrategia alternativa a la poliartritis por inyección de este inmunógeno que no provocará alteraciones sistémicas tan severas. La *Mycobacterium tuberculosis* contenida en el ACF produce una respuesta inflamatoria a través del sistema inmune adaptativo [38]. El curso temporal y varios de los mecanismos fisiopatológicos de esta respuesta han sido detalladamente descritos en múltiples estudios [8], [40], [41].

En el caso de los modelos de dolor neuropático, las estrategias se subdividen en: 1) aquellas en que se inducen a nivel central, ya sea por trauma, injuria química o inflamación en la médula espinal y 2) las que se inducen a nivel periférico, que consisten en la ligadura, constricción o transección parcial de los nervios raquídeos [34]. En la mayoría de los modelos utilizados en la actualidad, las alteraciones son realizadas en un miembro posterior, causando un daño parcial en los nervios periféricos o espinales [42]. Entre los modelos más empleados para generar un trauma mecánico en los nervios figuran la lesión

por constricción crónica (*Chronic constriction injury*, CCI) del nervio ciático [43], la ligadura parcial del nervio ciático (*Partial ligation of the sciatic nerve*, pSNL) [44], la ligadura del nervio espinal (*Spinal nerve ligation*, SNL) [45] y la ligadura neural por omisión (*Spared nerve injury*, SNI) [46]. Estos modelos producen signos conductuales característicos del dolor neuropático, que también son observados en los pacientes con este tipo de patología [42]. En el modelo de CCI se genera una mononeuropatía periférica mediante ligaduras poco constrictivas alrededor del nervio ciático común. Luego de la lesión, los animales muestran claros comportamientos de hiperalgesia, alodinia y, posiblemente, dolor espontáneo.

Para determinar el grado de nocicepción en los animales de experimentación, se estudian la hiperalgesia y la alodinia inducidas mediante la aplicación de estímulos térmicos o mecánicos [34], [35]. El desarrollo de estos modelos ha permitido dilucidar algunos de los mecanismos subyacentes de esta patología, el diseño de estrategias terapéuticas y el diagnóstico acertado de la enfermedad [42]. Para el desarrollo de esta tesis hemos puesto a punto un modelo de dolor inflamatorio en rata y otro de dolor neuropático en ratón.

MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DEL DOLOR

SUSTRATOS NEUROANATÓMICOS

Los esfuerzos científicos por comprender la capacidad sensorial se iniciaron con Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829), quien postuló que la sensación se produce cuando se genera un movimiento en el líquido de un nervio sensorial. Erasmus Darwin (1731-1802) fue uno de los primeros en proporcionar evidencia de la existencia de nervios específicos que detectan el calor. Posteriormente otros fisiólogos de finales del siglo XVIII y principios de XIX afianzaron la idea de fibras nerviosas especializadas en la detección y transmisión de aspectos específicos del tacto. Maximilian von Frey (1852-1932) propuso un modelo según el cual el dolor y el tacto inocuo eran cualidades táctiles independientes detectadas por diferentes tipos de nervios sensoriales. Ahora sabemos que los diversos estímulos son detectados por neuronas somatosensoriales [47].

La nocicepción es el proceso mediante el cual una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, llamadas nociceptores, detecta estímulos térmicos, mecánicos o químicos intensos, provenientes tanto del medio externo como interno. Los somas de estas neuronas se localizan en los ganglios de la raíz dorsal y en el ganglio trigémino, emitiendo desde aquí

fibras nerviosas centrales que se dirigen hacia la médula espinal o al tronco encefálico según la región involucrada. Las fibras sensitivas primarias se clasifican en A α , A β , A δ y C de acuerdo a sus características físicas y los posibles estímulos sensoriales transmitidos. Las fibras A α son propioceptivas, sin sensibilidad térmica, mielinizadas, con un diámetro de 13 a 20 μm y una velocidades de conducción de 80 a 120 m/s. Transportan información sobre la posición de las extremidades, músculos y cápsulas articulares [48], [49].

Las fibras A β actúa como mecanorreceptores (umbral de fuerza de 1 a 1,5 mN) y sin sensibilidad térmica. Están mielinizadas y presentan un diámetro de 6 a 12 μm , lo que le proporciona una velocidad de conducción de 35 a 90 m/s, transportan información de tacto y presión desde la piel [48], [49].

Las A δ participan en la nocicepción (umbral de fuerza de 5 mN) y son térmicamente sensibles. Son fibras poco mielinizadas, con un diámetro de 1 a 5 μm y una velocidad de conducción de 5 a 40 m/s, transportando información de calor, frío y mecánica. Las A δ median el primer dolor (agudo), bien localizado y rápido, que aparece frente a un estímulo nocivo [49], [50], [51].

Al igual que las A δ , las fibras C funcionan en la nocicepción y son térmicamente sensibles. Las fibras C, son amielínicas, con un diámetro de 0,02 a 1,5 μm y una velocidad de conducción de 0,5 a 2 m/s. Transportan información polimodal sobre la nocicepción mecánica, térmica y/o química. Este tipo de nociceptores son responsables de la transmisión del dolor lento y mal localizado, de carácter más sordo y duradero [49], [50], [51].

El asta dorsal de la médula espinal es una importante región de recepción de fibras aferentes primarias que transmiten información de receptores sensitivos que responden a estímulos internos y externos. A este nivel ocurre la primera sinapsis en las vías ascendentes que llevan al cerebro la información sensitiva que subyace a la percepción consciente del dolor [52]. El asta dorsal de la médula espinal, al igual que el resto de la sustancia gris de este órgano, se encuentra organizada en láminas. Dichas láminas, clasificadas por Rexed, se enumeran, desde la región más dorsal a la más ventral, en láminas I, II, III, IV y V [53]. La lámina I concentra la mayor densidad de neuronas de proyección del asta dorsal, que a su vez constituye el 5% de las neuronas de proyección presentes en la sustancia gris de la médula espinal [54], [55]. Las neuronas de proyección de la lámina I se dirigen principalmente hacia el tálamo y sus axones constituyen aproximadamente la mitad del tracto espinotalámico. Esta proyección es muy relevante para los aspectos discriminativos del dolor y la termoalgesia [56]. Asimismo, parte de sus axones terminan en el núcleo parabraquial, que media los aspectos emocionales del dolor [57]. En esta lámina, también se encuentran interneuronas, pero de menor tamaño que las neuronas

de proyección [53], [58]. En la lámina II, la mayor parte de neuronas son interneuronas pequeñas muy compactamente distribuidas. La lámina III, también tiene una alta densidad de neuronas, de las cuales la mayor parte son interneuronas pequeñas, pero mayores que las de la lámina II, con neuronas de proyección grandes dispersas. Por último, las láminas IV-V son más heterogéneas, con neuronas de varios tamaños, algunas de las cuales son neuronas de proyección [58].

Las fibras aferentes nociceptivas hacen sinapsis con neuronas localizadas en las láminas I, II y V, mientras que las fibras aferentes A β no nociceptivas se proyectan hacia las láminas profundas (III, IV y V). Los nociceptores A δ se proyectan tanto a la lámina I como a la lámina V, en tanto que los nociceptores C se proyectan más superficialmente, en las láminas I y II [52]. Esta notable estratificación de subtipos aferentes dentro del asta dorsal se destaca aún más por los distintos patrones de proyección y circuitos activados por los nociceptores C. Por ejemplo, la mayoría de las fibras peptidérgicas C terminan dentro de la lámina I y la lámina II interna. Por el contrario, las aferencias no peptidérgicas terminan en la lámina II externa [59], [60] (Figura 1).

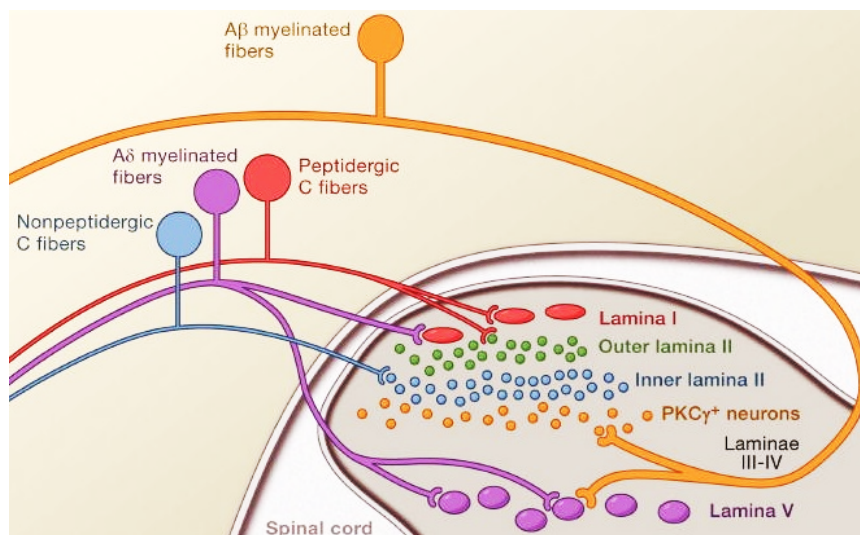


Figura 1. Conexiones entre las fibras aferentes primarias y la médula espinal. Subconjuntos de fibras aferentes primarias se dirigen a las neuronas del asta dorsal dentro de láminas discretas. Los nociceptores peptidérgicos C (rojo) amielínicos y A δ mielinizados (púrpura) terminan más superficialmente, haciendo sinapsis con neuronas de proyección grandes (rojo) ubicadas en la lámina I e interneuronas (verde) de la lámina II externa. Los nociceptores no peptidérgicos, amielínicos (azul) se dirigen a las interneuronas (azul) en la parte interna de la lámina II. Por el contrario, la información inocua transportada por fibras mielinizadas A β (naranja) termina en interneuronas en la mitad ventral de la lámina II interna. Un segundo conjunto de neuronas de proyección dentro de la lámina V (púrpura) recibe información convergente de las fibras A δ y A β . Extraído de Basbaum et al., 2009 [52].

Luego de la primera sinapsis entre las fibras aferentes nociceptivas y las neuronas del asta dorsal, la información del estímulo nocivo, asciende hacia áreas supraespinales para su procesamiento. Las neuronas de proyección que se encuentran en las láminas I y V constituyen la principal salida del asta dorsal al cerebro, originando múltiples vías ascendentes, incluidos los tractos espinotalámico y espinorreticulotalámico, que transportan información de dolor al tálamo y al tronco del encéfalo, respectivamente. El tracto espinotalámico destaca en los aspectos sensoriales-discriminativos de la experiencia del dolor, localizando el lugar del estímulo y su intensidad, en tanto que el espinorreticulotalámico es más relevante para los dolores mal localizados. Asimismo, las proyecciones de la médula espinal hacia el núcleo parabraquial de la protuberancia dorsolateral, generan una conexión con la amígdala, región encargada de procesar información relativa a las propiedades aversivas de la experiencia del dolor. Seguidamente, desde estas regiones del tronco encefálico y del tálamo, la información alcanza las estructuras corticales [52]. De este modo, el dolor resulta de la activación de estructuras corticales, algunas de las cuales están más asociadas con las propiedades sensoriales discriminativas, como es el caso de la corteza somatosensorial, mientras que la circunvolución cingulada anterior y la corteza insular se relacionan con aspectos emocionales de la experiencia del dolor [61]. Además de dichos trayectos de la información dolorosa, algunas neuronas de proyección contactan con neuronas de la médula ventromedial rostral y de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo, activando los sistemas de retroalimentación descendente que influyen (tanto positiva como negativamente) en la transmisión de mensajes de dolor a nivel de la médula espinal [52] (Figura 2).

Las alteraciones de estas vías del dolor conducen a alodinia e hipersensibilidad, de modo que el dolor deja de ser útil como sistema de alerta aguda y, en cambio, se vuelve crónico y debilitante.

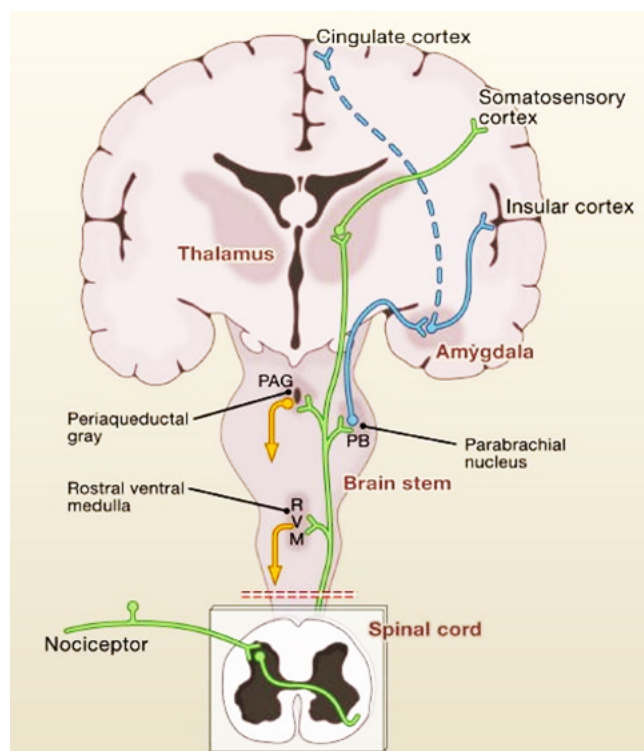


Figura 2. Anatomía de la vía del dolor. Los nociceptores aferentes primarios transmiten información nociva a las neuronas de proyección dentro del asta dorsal de la médula espinal. Un subconjunto de estas neuronas de proyección transmite información a la corteza somatosensorial a través del tálamo, proporcionando información sobre la ubicación y la intensidad del estímulo doloroso. Otras neuronas de proyección interactúan con las cortezas cingulada e insular a través de conexiones en el tronco del encéfalo (núcleo parabraquial) y la amígdala, contribuyendo al componente afectivo de la experiencia del dolor. Esta información ascendente también accede a las neuronas de la médula ventral rostral y de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo para activar los sistemas de retroalimentación descendente que regulan la salida de la médula espinal. Extraído de Basbaum et al., 2009 [52].

MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DEL DOLOR AGUDO

Las fibras aferentes primarias detectan estímulos ambientales e internos térmicos, mecánicos o químicos, y transducen esta información al lenguaje del sistema nervioso, es decir, en señales eléctricas [52]. La capacidad de las neuronas somatosensoriales de responder a una amplia variedad e intensidad de estímulos, se debe a la presencia de canales catiónicos específicos presentes en las membranas plasmáticas de sus terminales periféricas [62]. De esta manera, dependiendo de la modalidad de un nociceptor previamente inactivo, los receptores expresados en la membrana plasmática responden abriendo canales catiónicos. La despolarización inducida por la entrada de calcio estimula los canales de sodio dependientes de voltaje cercanos, desencadenando un potencial de acción aferente [63].

La mayor parte de estos receptores corresponden a la familia de Receptor de Potencial Transitorio (*Transient Receptor Potential*, TRP). Los TRP son canales de cationes no selectivos con alta permeabilidad al Ca^{2+} . La familia de los TRP está constituida por seis subfamilias de TRP; clasificadas como canónico (TRPC), vaniloide (TRPV), ankirina (TRPA), melastatina (TRPM), polycistina (TRPP) y mucolipina (TRPML) [62].

La subfamilia TRPV se encuentra en los nociceptores térmicos y es responsable de la transducción de estímulos térmicos de altas temperaturas. TRPV1 se expresa en las fibras C y TRPV2 se expresa en fibras A δ ; estos receptores son los principales termorreceptores nocivos sensibles al calor; activándose entre 40 a 43°C y 52°C respectivamente [48], [63], [64]. Asimismo, se configuran dinámicamente; ya que en condiciones de inflamación, los receptores TRPV pueden reducir significativamente sus umbrales, activándose con temperaturas cálidas inocuas. Los receptores TRPV1 pueden ser polimodales y detectan además múltiples estímulos químicos nocivos (capsaicina, protones y toxinas, entre otros) [48], [49], [50].

Si bien se sabe que las fibras C y A δ responden principalmente a agresiones mecánicas nocivas, en comparación con la cantidad de información que se conoce sobre los receptores térmicos, se sabe muy poco sobre los receptores mecánicos y la transducción de fuerzas mecánicas nocivas. Una última hipótesis es que las fuerzas mecánicas nocivas podrían lesionar las delicadas terminaciones nerviosas nociceptivas y producir contenidos intracelulares como la adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*, ATP) y neuropéptidos, provocando inflamación, despolarización neuronal y sensación de dolor [65].

Una vez que las señales nocivas son transducidas por el terminal periférico aferente primario, el potencial del receptor activa una variedad de canales iónicos dependientes de voltaje. Los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje son fundamentales para la generación de potenciales de acción que transmiten señales de nociceptores a las sinapsis en el asta dorsal. Los canales de calcio dependientes de voltaje desempeñan un papel clave en la liberación de neurotransmisores desde las terminales centrales o periféricas de las fibras aferentes nociceptivas para generar dolor o neuroinflamación local, respectivamente. De esta forma, el dolor agudo (adaptativo y con función protectora) se produce mediante la liberación de glutamato desde las terminales centrales de las fibras aferentes nociceptivas, generando corrientes postsinápticas excitadoras (*Excitatory postsynaptic potential*, EPSC) en las neuronas del asta dorsal de segundo orden. Esto ocurre principalmente mediante la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato del subtipo receptores ácido-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) y kainato (*Kainic acid receptor*, KAR) en la membrana postsinápticas. La suma de EPSC subumbral en la neurona postsináptica eventualmente dará como resultado la generación del potencial de acción y la

transmisión del mensaje de dolor a neuronas de orden superior. En estas condiciones, el subtipo N-metil-D-aspartato (*N-methyl-D-aspartate*, NMDA) de los receptores de glutamato es silencioso [52].

Los axones de las neuronas de proyección del asta dorsal, ascienden por la médula espinal y cruzan los tractos ventrolaterales antes de alcanzar finalmente sus objetivos supraespinales, siguiendo dos trayectorias distintas. Estas distintas trayectorias diferencian si el estímulo transportado proporcionará en última instancia la ubicación y la intensidad del estímulo o se integrará en una respuesta emocional. Siguiendo el primer camino, para que un estímulo proporcione información de ubicación e intensidad, debe salir de los tractos ventrolaterales de la médula espinal y luego ingresar al tálamo somatosensorial. Desde allí, una neurona terciaria llevará la señal a su destino final en la corteza somatosensorial. Respecto a la segunda vía, si un estímulo requiere integración en la emoción, debe salir de los tractos ventrolaterales de la médula espinal y hacer sinapsis con neuronas terciarias en el tálamo medial y ventromedial. Las neuronas terciarias salen del tálamo y terminan en la ínsula inferior o en el núcleo cingulado anterior, ambos involucrados en el prosencéfalo límbico [49], [63].

Al finalizar el estímulo, las señales nociceptivas cesan, inactivando al receptor. Incluso, el influjo de calcio, a través de los receptores nociceptivos abiertos, puede inducir el colapso de la fibra nociceptiva, provocando refractariedad a la re-estimulación. Este colapso del nociceptor después de la estimulación, respalda el hallazgo de que los estímulos nocivos se ajustan rápidamente y su percepción consciente disminuye una vez que cesa su actividad periférica [63].

La activación sucesiva de los nociceptores determina modificaciones en la reactividad del sistema nervioso en las vías y circuitos que codifican el dolor, lo cual resulta en su cronificación y produce sensaciones de dolor que pueden llegar a ser incapacitantes [66]. Estos cambios de neuroplasticidad determinan la sensibilización periférica en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios de la raíz dorsal y los ganglios del trigémino, y la sensibilización central de las neuronas procesadoras del dolor en la médula espinal y el cerebro (Figura 3) [52], [67], [68], [69], [70].

Sensibilización Periférica

La sensibilización periférica representa una forma de plasticidad estructural y funcional del nociceptor, provocada por estímulos, que afecta la codificación y transmisión de la información sensorial [68], [71]. El aumento de la excitabilidad de las neuronas sensoriales puede tener consecuencias funcionales devastadoras y puede contribuir directamente a los estados de hiperalgesias al reducir los umbrales en los que se siente dolor, y exacerbar el

grado de respuestas a los estímulos supraumbrales, e incluso puede causar reflejos autónomos y somáticos anormales. En estas situaciones, el estímulo es un conjunto de mediadores inflamatorios endógenos que acompañan el daño tisular, y que sensibilizan a los nociceptores, reduciendo su umbral y aumentando su capacidad de respuesta. Estos son liberados por los nociceptores activados y células no neuronales que residen o se infiltran en el área lesionada, tales como mastocitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Dichos factores, incluyen varias moléculas de señalización, tales como neurotransmisores, péptidos (sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, bradicinina, etc.), eicosanoides, lípidos relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocannabinoides), neurotrofinas, citoquinas y quimiocinas, así como proteasas y protones extracelulares. La unión de estos mediadores inflamatorios a sus receptores presentes en la superficie celular de los nociceptores desencadena un conjunto de cascadas de señalización intracelular que llevan a un aumento en la facilidad de despolarización de los mismos. [52], [71].

Un ejemplo de mediadores críticos de la actividad de los nociceptores y la sensibilización al dolor, son las citoquinas proinflamatorias tales como la interleuquina-1 β (*Interleukin-1 β* , IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (*Tumor necrosis factor α* , TNF- α), que actúan directamente sobre los nociceptores [72]. Ambas citoquinas, tienen un rol crucial en la sensibilización de los neuroreceptores, activando canales dependientes de sodio, así como aumentando la expresión de TRPV1 [73], [74], [75], [76], [77]. Esto significa que, tanto IL-1 β como TNF- α periféricos están fuertemente implicados en la patogénesis del dolor inflamatorio y neuropático [78], [79], [80].

La inflamación periférica con la resultante entrada nociceptiva persistente también conduce a una mayor liberación de glutamato, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*Calcitonin gene related peptide*, CGRP) y factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), desde las terminales centrales aferentes primarias. Estos son liberados en el asta dorsal de la médula espinal (y el núcleo del trigémino) y mediante la transducción de señales producen un estado de hiperactividad e hiperexcitabilidad neuronal en la médula espinal, conocido como sensibilización central [67].

Sensibilización Central

Desde hace más de 40 años la sensibilización central ha demostrado ser un mecanismo crucial en la cronificación del dolor, al transformar la percepción normal del tacto en alodinia mecánica [81]. El circuito clave responsable de este fenómeno, reside en el asta dorsal de la médula espinal [82]. Consiste en una potenciación de la función de las neuronas y circuitos en las vías nociceptivas, causada por aumentos en la excitabilidad de la membrana

y la eficacia sináptica, así como por una reducción de la inhibición, siendo una manifestación de la notable plasticidad del sistema nervioso somatosensorial en respuesta a la actividad, la inflamación y/o la lesión neuronal tanto periférica como central [83]. Por tanto, la plasticidad sináptica en las sinapsis excitadoras e inhibitoras constituye la base subyacente de la sensibilización central [69]. En este caso, las células postsinápticas que transmiten información hacia regiones supraespinales, producen una salida aumentada para un nivel dado de estimulación periférica y, en algunos casos, comienzan a responder sin necesidad de estímulo [84]. Además de resultar en la reducción del umbral del dolor y la amplificación de las respuestas al dolor, también permite que las entradas desde tejidos no lesionados produzcan dolor (hiperalgesia secundaria) [85], [86]. Esta hiperreactividad al dolor característica de su condición patológica, expresa una alteración en el equilibrio entre excitación e inhibición en los circuitos espinales [87].

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en la vía del dolor [67]. Si bien no hay marcadores inmunocitoquímicos confiables para los cuerpos celulares de las neuronas glutamatérgicas, sus axones pueden identificarse por la presencia del transportador vesicular de glutamato (*Vesicular glutamate transporter*, VGLUT), que media la captación de glutamato en las vesículas presinápticas [88]. En las láminas I-III del asta dorsal hay numerosas terminales presinápticas que contienen VGLUT del tipo 2 (VGLUT2), la mayoría de las cuales se originan en interneuronas excitadoras locales [88], [89], [90]. Más precisamente, análisis inmunohistoquímicos con marcadores VGLUT han mostrado que más del 85% de las neuronas de la lámina II son interneuronas excitadoras/liberadoras de glutamato [90], [91]. Se ha visto que la activación de VGLUT2 provoca un profundo aumento en la activación neuronal y la liberación sináptica de glutamato por parte de las neuronas que lo expresan. Por el contrario, su silenciamiento génico reduce notablemente la actividad neuronal y la liberación sináptica de glutamato, revirtiendo la hipersensibilidad al dolor inducida por la inflamación del tejido y la lesión de los nervios periféricos [92]. Esto indica que las neuronas excitadoras que expresan VGLUT2 desempeñan un papel crucial en la mediación de la sensibilización central. Es probable, que la entrada excitatoria dual de las fibras aferentes primarios y las interneuronas que expresan VGLUT2, sirva como un circuito de retroalimentación positiva intraespinal para el mantenimiento de la sensibilización central [93], [94]. En el caso de las interneuronas excitatorias, estas transmitirán la información nociceptiva desde las fibras aferentes primarias a las neuronas de proyección espinal en condiciones de dolor fisiológico [92].

Un paso indispensable para el inicio y mantenimiento de la sensibilización central, es la exacerbación de la activación de los receptores NMDA en las membranas postsinápticas [67], [95], [96]. En condiciones fisiológicas, el receptor NMDA se encuentra bloqueado por iones de magnesio. Sin embargo, tras la despolarización de las neuronas espinales,

después de la activación de las aferencias primarias nociceptivas, dicho bloqueo es eliminado. De esta forma, la activación de receptores NMDA aumenta la eficacia sináptica y provoca una corriente entrante de calcio. La entrada de calcio activa diversas vías de señalización intracelular que inician y mantienen la sensibilización central [83], [85]. Una de estas vías lleva al aumento de la expresión y activación de las subunidades NR2B de los receptores NMDA que, junto con las subunidades NR1, regula la plasticidad sináptica espinal en condiciones de dolor persistente [97]. Por ejemplo, mediante la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular - Signal - Regulated Kinase*, ERK) a través de su fosforilación (pERK) [98], [99], [100], [101], [102]. Por otra parte, pERK también induce sensibilización central a través de una rápida regulación postraduccional de la supresión de la actividad del canal de potasio Kv4.2, lo que conduce a una hiperactividad de las neuronas del asta dorsal [103], [104].

Otro aspecto importante de las postsinapsis excitadoras que expresan receptores NMDA, son las proteínas de andamiaje PSD. En particular, PSD95, es la principal proteína de andamiaje en la densidad postsináptica excitatoria y un potente regulador de la fuerza sináptica, uniéndose a dominios citoplasmáticos de las subunidades NR2, y aglutinando receptores NMDA en las sinapsis neuronales, por lo que se utiliza como evidencia de actividad sináptica [105], [106]. Uno de los principales roles de PSD95 es, a través de sitios de unión, reclutar la proteína óxido nítrico sintasa neuronal (*Neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) [107], [108], [109], [110]. De esta manera, PSD95 permite que la entrada de calcio, producto de la activación de los receptores NMDA, active a su vez a nNOS generando óxido nítrico (*Nitric oxide*, NO), el cual en última instancia promueve la hiperalgesia [111], [112], [113]. Esta interacción nNOS-PSD95 es importante para mantener la hipersensibilidad en el dolor crónico [114]. PSD95 desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica y la estabilización de los cambios sinápticos durante la potenciación a largo plazo, y cambios en sus niveles de expresión alteran los procesos centrales que controlan la fuerza sináptica [115], [116]. Se ha visto que la sobreexpresión de PSD95 afecta fuertemente la función sináptica, aumentando la amplitud de la corriente postsináptica excitatoria (EPSC) por los mismos procesos de fortalecimiento que ocurren durante la potenciación a largo plazo [117], [118]. Por el contrario, la reducción de la expresión de PSD95 disminuye el EPSC debilitando la fuerza sináptica [116], [119]. El enriquecimiento selectivo de PSD95 en la región superficial del asta dorsal en la médula espinal, media la hiperalgesia inducida por activación de NMDA [105]. En concordancia con esto, la deficiencia de PSD95 en el asta dorsal de la médula espinal atenúa significativamente la hiperalgesia en modelos de dolor neuropático [120]. En ratas, el uso de oligonucleótidos antisentido para PSD95 disminuyó la hiperalgesia y retrasó el desarrollo del dolor neuropático [105]. Asimismo, estudios con ratones que expresaban una forma mutante de PSD95 que no podía asociarse con el

receptor NMDA, tampoco lograron desarrollar hiperalgesia y alodinia después de la lesiones por CCI [121], [122]. Similares resultados se obtuvieron, tanto en modelos de dolor neuropático como inflamatorios, con la utilización de péptidos miméticos que interrumpen la interacción entre las subunidades PSD95 y NR2B [123], [124], [125], [126]. Por lo tanto, el desacoplamiento de PSD95 con la subunidad NR2 de los receptores NMDA, puede prevenir la neuroplasticidad involucrada en el dolor crónico [123]. De manera similar, estudios con inhibidores de la unión de PSD95 a la nNOS mostraron eficacia antinociceptiva en modelos de dolor neuropático inducidos por el fármaco quimioterapéutico paclitaxel y en modelos de dolor inflamatorio por formalina y por ACF [127]. Todos estos estudios sugieren que PSD95 es fundamental para la hipersensibilidad al dolor mediada por NMDA-nNOS.

En el sistema somatosensorial, las neuronas inhibitoras espinales contrarrestan el aumento de la transmisión sináptica excitatoria desde la entrada periférica. Las vías inhibitoras de interneuronas locales y descendentes, como las vías GABAérgicas, contribuyen de manera crítica a la modulación del equilibrio entre el tono excitador e inhibitor en la transmisión sináptica [128]. Las vías descendentes GABAérgicas del sistema somatosensorial se originan en el locus cerúleo, el núcleo de rafe y la sustancia gris periacueductal, terminando en la médula espinal [129]. Por su parte, y a diferencia de la proporción de interneuronas excitadoras en la población neuronal total del asta dorsal, la proporción de interneuronas inhibitoras locales, GABAérgicas y glicinérgicas, representan un tercio de dicho total [130], [131]. Los axones de las interneuronas inhibitoras se pueden identificar con anticuerpos contra el transportador vesicular GABA (*Vesicular GABA Transporter*, VGAT), GAD, o el transportador de glicina (*Glycine transporter 2*, GlyT2). Estos revelan un denso plexo de axones inhibitoros en las láminas I-III del asta dorsal, la mayoría de los cuales se originan en interneuronas locales [132].

La desinhibición de la transmisión sináptica GABAérgica y glicinérgica en las vías espinales de dolor es crucial en la generación de la sensibilización central y el consecuente dolor crónico [132], [132], [133]. En varios modelos animales de dolor crónico, neuropático e inflamatorio, se ha observado una pérdida de la inhibición mediada por GABA. Tanto las inhibiciones presinápticas sobre fibras aferentes primarias, como las inhibiciones postsinápticas sobre interneuronas excitatorias, se vuelven menos eficientes, lo que lleva a un estado de hiperexcitabilidad en el asta dorsal de la médula espinal [134], [135], [136].

GAD67 (67 kDa) es una enzima citosólica responsable de la síntesis de GABA, y la reducción de su expresión en las interneuronas inhibitoras del asta dorsal tiene como consecuencia la disminución de la síntesis de GABA [137], [138]. Estudios en modelos de dolor neuropático inducido por paclitaxel y por lesiones de nervios periféricos, han mostrado que tras la injuria, la expresión de GAD67 en el asta dorsal se encuentra disminuida, lo que conduce a una alteración significativa de la función de las sinapsis GABAérgicas [139]. De

igual forma, se ha evidenciado que lesiones de médula espinal producen conductas de dolor neuropático que están relacionadas con la regulación negativa de la expresión de GAD en el asta dorsal [140], [141].

Los receptores de GABA más ampliamente estudiados son GABAA y GABAB. GABAA es un canal selectivamente permeable a los iones cloruro, expresado en toda la sustancia gris de la médula espinal, y su activación aumenta la permeabilidad de los iones cloruro, induciendo así la hiperpolarización de las neuronas postsinápticas [142], [143]. En cambio, GABAB es un receptor metabotrópico, acoplado a una proteína G, expresado en las láminas I-III del asta dorsal, tanto en neuronas como en células gliales [144], [145].

Luego de su liberación, el neurotransmisor GABA puede ser recaptado a través de transportadores de GABA (*GABA transporters*, GAT) [146]. La sobreproducción de GAT en neuronas del asta dorsal en condiciones fisiopatológicas facilita la captación de GABA, dando como resultado una pérdida del tono GABAérgico en los circuitos espinales y una hiperexcitabilidad de las neuronas. Estos datos sugieren que los GAT contribuyen a la transmisión nociceptiva en el asta dorsal [128].

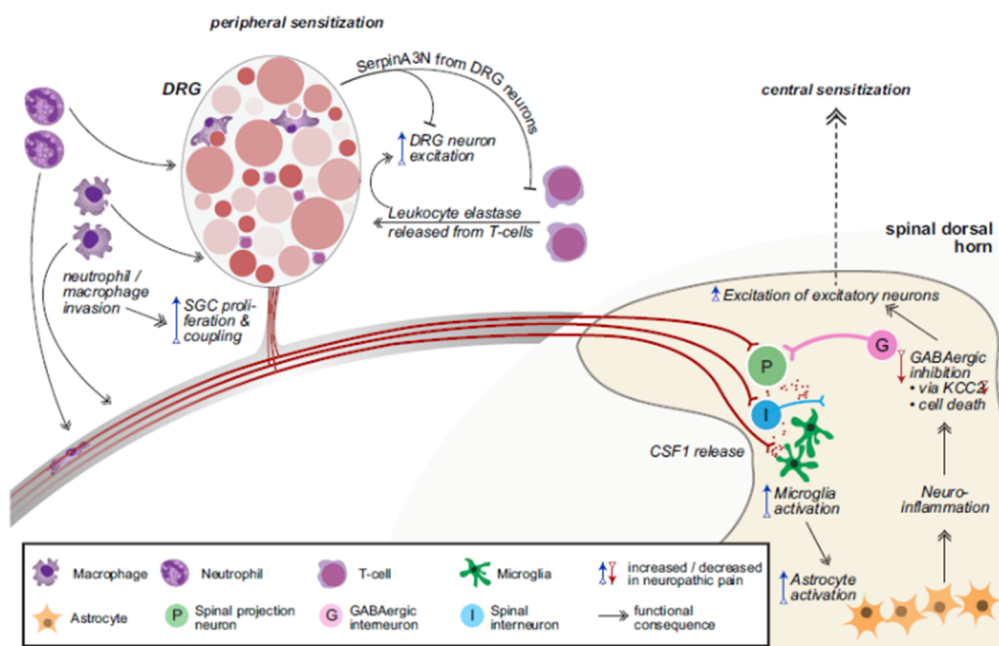


Figura 3. Participación de los procesos neuroinflamatorios periféricos y centrales en el dolor crónico. Los neutrófilos y macrófagos invasores sensibilizan las neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (GRD) a través de mediadores como las interleucinas y el factor de necrosis tumoral- α durante las primeras etapas del dolor neuropático. Las aferencias sensibilizadas liberan factores en el asta dorsal para activar la microglía, lo que a su vez provoca la activación y proliferación de los astrocitos. La liberación resultante de mediadores neuroinflamatorios provoca cambios en la conductancia del cloruro de las neuronas diana en la lámina I, lo que resulta en una reducción de la inhibición y la sensibilización de las neuronas espinales que procesan la información nociceptiva y no nociceptiva. SGC, célula ganglionar satélite. Extraído de Finnerup et al., 2021 [87].

Matriz extracelular y neuroplasticidad

Además de los elementos celulares del tejido nervioso, otro actor importante en los procesos de neuroplasticidad, es la MEC que los circunda [147], [148], [149], [150], [151].

La MEC ocupa aproximadamente el 20% del volumen total del sistema nervioso central (SNC) adulto, proporcionando soporte estructural y funcional, siendo sintetizada por neuronas y células gliales [152], [153], [154], [155]. Dentro de los principales componentes de la MEC del SNC se encuentran proteoglicanos de heparán sulfato; proteoglicanos de condroitina sulfato como el agregano, el brevicano y el neurocano; glucoproteínas, como láminas y tenascinas; y grandes moléculas de ácido hialurónico y de colágeno; además de proteínas de enlace, entre otros [156], [157], [158]. Además de constituir la lámina basal de la barrera hemato encefálica y de encontrarse rodeando los nodos de Ranvier de los axones (MEC perinodal), los componentes de la MEC se pueden organizar en condensaciones reticulares conocidas como redes perineuronales (RPN) y en material difuso [159], [160]. Del total de proteoglicanos de condroitina sulfato de la MEC del SNC, el 98% está presente en la matriz difusa general y perisináptica, mientras que el restante 2% se encuentran formando parte de las RPN [161]. Las RPN se localizan alrededor de distintas clases de neuronas inhibitoras y excitadoras a lo largo de todo el SNC, desde la corteza hasta la médula espinal, estando particularmente desarrolladas en mamíferos [162], [163], [164], [165]. Estas estructuras actúan como andamiajes moleculares, proporcionando estabilidad y regulación a las sinapsis circundantes [147], [166]. Por su parte, la matriz difusa ocupa el espacio intersticial y sináptico, formando cubiertas axonales compuestas de agregano y brevicano. Estas cubiertas rodean los botones sinápticos que establecen contacto con dendritas y somas neuronales [163], [165], [167]. Además, pueden asociarse con las RPN, lo que restringe la difusión de neurotransmisores y regula la localización de sus receptores y canales iónicos [163], [164], [165], [168].

Si bien las primeras evidencias de las modificaciones de la MEC en respuesta a la actividad neuronal provienen del desarrollo, en particular en el periodo posnatal conocido como periodo crítico [147], [169], en los últimos años han surgido nuevas evidencias sobre la naturaleza dinámica de la composición y regulación de la MEC en el SNC adulto [149], [170], [171], [172], [173], [174].

La eliminación de las RPN o de sus componentes en individuos adultos, tanto por depleción genética como por digestión enzimática, restablece la neuroplasticidad a niveles similares a los característicos del periodo crítico [147], [175], [176], [177]. Otros estudios han evidenciado la importancia de la matriz perisináptica difusa en lo concerniente al mecanismo de neuroplasticidad. Por ejemplo, se ha visto que su degradación induce plasticidad estructural al aumentar el número de espinas dendríticas [178], y plasticidad funcional

medida por potenciación a largo plazo [179]. El conjunto de estos hallazgos sugieren que los componentes de la MEC estarían restringiendo la neuroplasticidad en distintas situaciones y modelos, influyendo así en el equilibrio excitación-inhibición del sistema. Además, la degradación de los componentes de la MEC mediada por metaloproteasas de la matriz secretadas por células gliales y células del sistema inmune migrantes, genera fragmentos de ácido hialurónico y proteoglicanos sulfatados que actúan como patrones moleculares asociados a daños (*Damage-associated molecular pattern*, DAMPs) que provocan una neuroinflamación que se autopropaga, activando aún más las respuestas al daño de las células no neuronales, amplificando así la neuroinflamación [180].

CÉLULAS GLIALES Y DOLOR

Células gliales

El término “glia”, derivado de una antigua palabra griega que significa pegamento, fue acuñado por el neurocientífico alemán Rudolf Virchow en el año 1856, para describir al “tejido conectivo” que mantenía unidos los elementos nerviosos. No fue hasta 1913 que el neurocientífico español Santiago Ramón y Cajal, demostró que el tejido considerado anteriormente de relleno, se trataba de un conjunto de células individuales [181], [182].

Las células gliales son esenciales en la organización estructural y funcional del sistema nervioso. En el SNC comprenden astrocitos, oligodendrocitos y microglía además de las células del epéndimo que tapizan las cavidades. Si bien su proporción varía según la región, etapa de desarrollo y especie, bajo condiciones normales, en humanos se estima que en conjunto constituyen aproximadamente la mitad de las células del SNC. Las diferentes poblaciones de células gliales interactúan permanentemente entre sí y con el resto de los componentes del tejido nervioso (neuronas, células endoteliales, perivasculares y MEC, entre otros), colaborando de esta manera en la formación, mantenimiento y modificación de los circuitos neuronales. [183], [184].

La mayor parte de las células gliales del SNC tienen su origen embrionario a partir del neuroectodermo, salvo la microglía, que deriva de precursores provenientes del saco vitelino que migran hacia el SNC en etapas tempranas del desarrollo [185], [186].

Astrocitos

Los astrocitos, descritos por primera vez en 1913 por Santiago Ramón y Cajal mediante la tinción sublimada con cloruro de mercurio y oro, representan la población más abundante de células gliales en el SNC, y lo recubren en toda su extensión [181], [182].

Si bien su morfología y características específicas varían un poco dependiendo de la región considerada, se puede distinguir entre dos poblaciones astrocitarias. Por un lado, en la

sustancia blanca se encuentran los astrocitos fibrosos, mientras que en la sustancia gris se localizan los astrocitos protoplasmáticos. Los astrocitos presentan numerosas prolongaciones ramificadas que irradian desde el soma, y que en el caso de los astrocitos fibrosos son menos abundantes pero de mayor longitud. En la mayoría de las regiones del SNC los astrocitos expresan característicamente la proteína de filamento intermedio GFAP, y que es ampliamente utilizada como uno de los marcadores celulares para su detección [187], [188].

Los astrocitos están interconectados mediante uniones gap, formando un sincitio multicelular que los mantiene acoplados metabólicamente. Esto les permite desempeñar su función principal de mantener la homeostasis neuronal, proporcionando un microambiente estable y factores tróficos. Además, participan en la actividad sináptica a través de interacciones recíprocas con las neuronas [187], [188], [189]. En condiciones normales, captan el exceso de neurotransmisores e iones del medio extracelular y proveen metabolitos de la glucosa como sustratos energéticos para las neuronas. Son células polarizadas con prolongaciones que contactan con los vasos sanguíneos y las diferentes poblaciones celulares del SNC. Su posición estratégica con respecto a los vasos sanguíneos les concede la capacidad de intervenir en la regulación del flujo sanguíneo local y contribuir al drenaje del fluido intersticial [184], [187], [188], [189].

Los astrocitos expresan una variedad de receptores de neurotransmisores cuya activación puede provocar un aumento en el calcio intracelular. Este incremento en el calcio a su vez induce la liberación de gliotransmisores, como el glutamato, la D-serina y el ATP. [188], [189], [190]. No solo son capaces de responder a los neurotransmisores, sino que además pueden captarlos del medio extracelular mediante proteínas transportadoras. Un ejemplo de esto es el transportador glutamato-aspartato (*Glutamate-aspartate transporter*, GLAST) y el transportador glutamato-1 (*Glutamate transporter-1*, GLT1), que permiten la internalización de dicho neurotransmisor desde el espacio extracelular. Luego de su internalización, el glutamato es convertido por la glutamina sintetasa, enzima exclusiva de los astrocitos, en glutamina, parte de la cual es liberada para su posterior reciclaje en las neuronas [188], [191]. Además, los astrocitos responden al ATP a través de la activación del receptor purinérgico P2Y con generación de inositol trifosfato (*Inositol trisphosphate*, IP3) y elevación de calcio intracelular, siendo este otro mecanismo por el cual pueden modular la neurotransmisión y la plasticidad sináptica [188], [189], [190].

Microglía

La microglía fue identificada por primera vez en el año 1919 por el neurocientífico español Pío del Río Hortega mediante una técnica de impregnación de carbonato de plata [181].

Forman una población autorenovable que representa del 5 al 15% de las células del SNC adulto normal [184].

En una visión muy simplificada, la microglía está constituida por células inmunocompetentes y fagocíticas del SNC. Durante el desarrollo del SNC contribuye con la migración y eliminación programada de neuronas [192], [193]. En condiciones normales la microglía cumple un rol homeostático desempeñando la vigilancia inmune del SNC en todas las etapas del desarrollo. A través de movimientos rápidos de sus finos filopodios, que tienen receptores para componentes del complemento y para las regiones Fc de las IgG, detectan activa y constantemente el entorno, supervisando al SNC. De esta manera es capaz de responder a cambios o injurias leves, pudiendo fagocitar pequeñas partículas sin incurrir en cambios morfológicos importantes. Además, en el SNC adulto regula neurogénesis y plasticidad sináptica [193], [194], [195].

El aspecto morfológico de la microglía varía respecto a la región del SNC y momento del desarrollo. En el SNC adulto sano, la forma más recurrente presenta un cuerpo celular de pequeño tamaño con largas y delgadas prolongaciones que se ramifican en arborizaciones distales, conocida como "microglía ramificada". Este término, utilizado casi como sinónimo de microglía "en reposo", implica un vínculo íntimo entre morfología y función. Durante el desarrollo la microglía puede presentar morfología ameboide, mientras que en el envejecimiento adopta un aspecto hipertrófico característico de la senescencia y del deterioro funcional, con prolongaciones más cortas y delgadas [192], [196].

En el caso de la microglía y a diferencia de lo que ocurre con los marcadores de astrocitos, el origen y expresión de moléculas en común con otros macrofagos / monocitos periféricos, ha hecho más difícil su distinción respecto a estos últimos. Sin embargo, Iba-1 ofrece una marca clara tanto del soma como de las prolongaciones, siendo uno de los marcadores más utilizados para su visualización [192].

Reactividad glial

La reactividad glial constituye una respuesta de las células gliales a diversas formas de injuria al SNC, que abarca enfermedades neurodegenerativas, como enfermedades de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en infección y lesión, así como también el dolor crónico [197], [198], [199]. Los contextos patológicos en los que ocurre la reactividad de las células gliales pueden variar notablemente, siendo estos contextos esporádicos o mediados genéticamente, y pueden manifestarse en formas agudas o crónicas [200].

En los astrocitos, la reactividad se evidencia mediante un aumento en la proliferación celular y la aparición de cambios morfológicos, que incluyen la hipertrofia de los núcleos y los cuerpos celulares, el desarrollo de prolongaciones más gruesas y largas, así como un incremento en la expresión y redistribución de la proteína GFAP. Además, cambia la expresión génica y la producción de diversos factores de crecimiento y citoquinas [201], [202], [203]. Este “fenotipo reactivo”, mediado por señales según el contexto, pueden modificar su actividad ya sea con ganancia o pérdida de función, y de esta forma influir positiva o negativamente sobre las células cercanas. En este sentido, inicialmente se identificaron al menos dos tipos distintos de astrocitos reactivos que se clasifican en astrocitos pro-inflamatorios/neurotóxicos y astrocitos anti-inflamatorios/neuroprotectores. Originalmente, estos tipos fueron denominados astrocitos "A1" y "A2", respectivamente, y su clasificación guarda analogía con la diferenciación observada en los macrófagos, específicamente en los macrófagos proinflamatorios "M1" y los macrófagos antiinflamatorios "M2" [201], [204]. En experimentos pioneros en los que se analizaron los genes expresados diferencialmente en astrocitos reactivos aislados de dos situaciones de lesión diferentes, se determinó que, aunque ambos fenotipos compartían una serie de genes similares, otro grupo de genes variaba según el tipo de injuria, indicando que la reactividad glial no es un proceso tan estereotipado como se creía [204]. No obstante, los avances recientes en la secuenciación de ARN en célula única junto, con la evaluación de diversos parámetros moleculares y funcionales y el análisis exhaustivo de la diversidad regional y fenotípica dentro del SNC, han revelado que la heterogeneidad de los astrocitos reactivos va más allá del paradigma binario "A1"/ "A2". En su lugar, un espectro de estados reactivos de los astrocitos, definido por sus características funcionales y perfiles de expresión genética, refleja con mayor precisión sus respuestas en neuropatología [205].

La microglía reactiva presenta una reducción en la complejidad de su morfología; sus prolongaciones aumentan de grosor y se retraen, siendo reabsorbidas en el cuerpo celular, mientras que sus ramas más distales muestran una menor ramificación. Además, los cuerpos celulares incrementan su tamaño, dando lugar a una microglía hipertrófica, que en ocasiones adopta una morfología ameboide que facilita su migración hacia el sitio de lesión. Estos cambios morfológicos se acompañan de una rápida proliferación, así como de un incremento en la actividad fagocítica y en la expresión génica de numerosos receptores y citoquinas [193], [196], [202], [206].

De manera similar a los macrófagos periféricos, la microglía se clasifica en dos grandes grupos: la microglía pro-inflamatoria conocida como M1, y la anti-inflamatoria conocida como M2, [192], [196], [206], [207], [208]. Aunque la homeostasis se relaciona con el contexto 'fisiológico' evaluado en términos espaciales y temporales, no se asocia

necesariamente con un perfil molecular único. Esto se debe a que, incluso en ausencia de perturbaciones, la microglía exhibe una variedad de estados morfológicos y funcionales, dependiendo de las señales del microambiente del SNC. La naturaleza dinámica de estas células hace que la clasificación dualista de la microglía entre M1 y M2 resulte controversial y reduccionista. En los últimos años, los avances en los análisis epigenéticos, transcriptómicos, metabolómicos y proteómicos, han permitido un enfoque multidimensional respaldando la idea de que existe una amplia gama de fenotipos entre los extremos M1 y M2. De acuerdo con la evidencia disponible hasta el momento, todos estos estados microgliales parecen ser dinámicos y plásticos, potencialmente transitorios y altamente dependientes del contexto [208].

Participación de las células gliales en el dolor crónico

La reactividad glial acompaña la fisiopatología del dolor crónico y es un factor determinante en la inducción de neuroinflamación. En diversos modelos animales de dolor se ha observado reactividad glial en el SNC, en particular en la médula espinal, en algunos casos limitada al sector del asta dorsal ipsilateral a la injuria y en otros más generalizados [40], [198], [199], [209]. Algunos estudios han demostrado que la reactividad glial y el dolor crónico tienen una estrecha relación no sólo en modelos animales sino también en humanos [210]. Se constató un marcado aumento en el número de astrocitos y microglía en el asta posterior de la médula espinal de un paciente que padecía de síndrome de dolor regional complejo [211], y se observó un aumento significativo en GFAP y de la proteína de unión a calcio S100 β (marcador de astrocitos) en el asta dorsal de un paciente con virus de la inmunodeficiencia humana y síntomas de dolor crónico [212].

Tanto los astrocitos como la microglía, participan en la hipersensibilidad al dolor. Estas poblaciones de células gliales han sido reconocidas como participantes activos en el inicio y mantenimiento de la facilitación del dolor inducido por la inflamación y el daño, ya sea en los tejidos periféricos, en los nervios o en la médula espinal [40], [198], [199], [209].

El glutamato, la sustancia P, el BDNF, quimoquinas neuronales, ATP y activadores aún no identificados de receptores Toll expresados por las células gliales, se liberan en el asta dorsal después de la activación de las neuronas nociceptivas en el dolor crónico, y son capaces de inducir cambios en la microglía y en los astrocitos. A su vez, los astrocitos y la microglía reactivos a su vez, liberan citoquinas proinflamatorias (p. ej., IL-1 β , TNF- α e IL-6), ATP, aminoácidos excitadores y NO, entre otros. Las neuronas del asta dorsal expresan receptores para muchos de estos factores, incluidas las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , y su activación modifica la función neuronal. Por ejemplo, las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β aumentan la transmisión sináptica excitadora y suprimen la transmisión sináptica inhibitoria en las neuronas de la lámina II de la médula espinal,

sensibilizando aún más a las neuronas locales, lo que conduce a un ciclo de señalización nociceptiva [128], [213] (Figura 4).

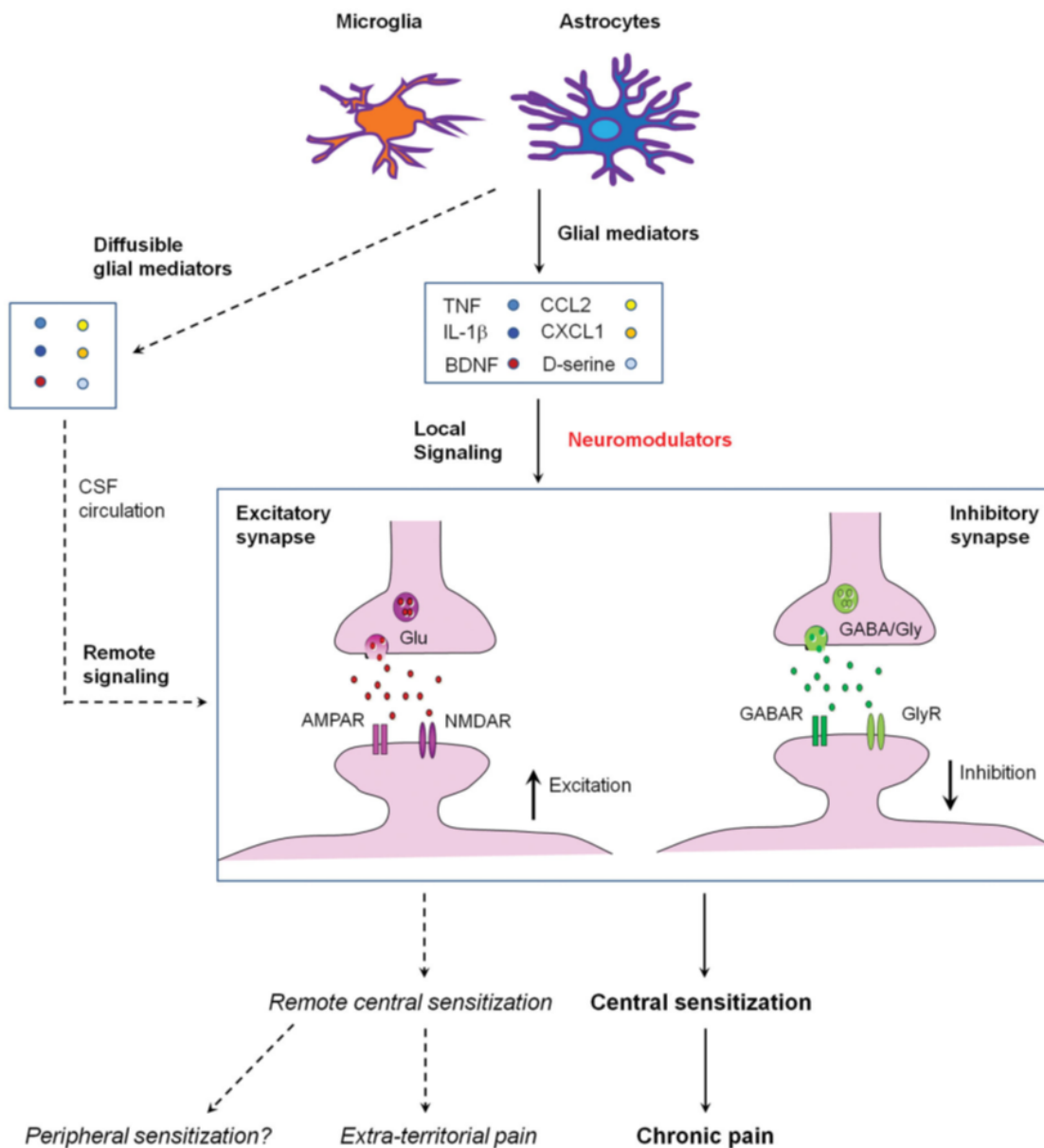


Figura 4. Sensibilización central local y remota inducida por la activación glial y la neuroinflamación en la médula espinal. La activación de la microglía y los astrocytes por agresiones dolorosas da como resultado la secreción de mediadores gliales como TNF, IL-1 β , CCL2, CXCL1, BDNF, D-serina, que pueden actuar como neuromoduladores para inducir una sensibilización central local en las sinapsis excitadoras circundantes (facilitación) y sinapsis inhibitorias (desinhibición). Durante la neuroinflamación, estos mediadores gliales también están presentes en el LCR y afectan las sinapsis en diferentes segmentos de la médula espinal para causar sensibilización central remota y dolor extraterritorial y generalizado más allá del sitio de la lesión inicial. Extraído de Ji et al., 2018 [67].

La microglia presenta receptores para ATP (P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12), para quimioquinas (CX3CR1, CCR2) y para NRG1 (ErB2). La activación de estos receptores induce la fosforilación de p38 y ERK (fase temprana) en la microglía conduciendo a la producción y liberación de las citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-18) y el factor de crecimiento BDNF, y la consiguiente sensibilización de las neuronas del asta dorsal. Además estos factores generan un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, propiciando el reclutamiento e infiltración de otras células desde la periferia incluidos neutrófilos (24h después de la injuria), macrófagos (3 a 7 días después de la injuria) y linfocitos T y B (luego de los 7 días de la injuria). Todos estos mediadores producidos por la microgliosis alteran la homeostasis del SNC, no solo en el asta dorsal, sino que también se extiende a regiones distantes como el tálamo, el hipotálamo, la médula ventromedial rostral y la sustancia gris periacueductal, alterando la plasticidad sináptica en estas regiones [199], [214], [215].

Los astrocitos por su parte, presentan una respuesta más tardía en comparación con la microglía; sin embargo, esta respuesta persiste durante un período más prolongado. Este comportamiento sugiere que los astrocitos podrían desempeñar un papel más relevante en el mantenimiento del dolor que en su inicio [209], [216], [217].

Los astrocitos pueden ser activados tanto por mediadores microgliales (TNF- α y IL-1 β), como por mediadores astrocíticos (MMP-2; y el factor de crecimiento de fibroblastos básico, *basic fibroblast growth factor*, FGF- β), que inducen la fosforilación de las quinasa c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinase*, JNKs) y ERK. Esta activación resulta en la posterior producción y liberación de quimioquinas y citoquinas (CCL2, IL-1 β y TNF- α). Además, tras la activación de sus hemicanales (Cx43 y PNX1) los astrocitos también liberan NO, ATP y glutamato, lo que aumenta la señalización desde las aferentes primarios o sensibilizar a las neuronas de segundo orden en la médula espinal. Otra respuesta a su activación es la regulación a la baja de los transportadores GLT1, disminuyendo la captación astrocítica de glutamato. Por su parte, la liberación de mediadores astrocitarios, como ser CCL2, IL-1 β , TNF- α , glutamato y BDNF, puede provocar sensibilización central mediada por receptores AMPA y NMDA. En el caso del BDNF, no solo aumenta la transmisión sináptica excitatoria, sino que también disminuye la actividad de neuronas GABAérgicas. En cuanto a la quimioquina CCL2 astrocítica, esta estimula potencialmente la división y diferenciación de la microglía, intensificando su activación y, directa e indirectamente, la progresión del dolor. De esta manera, todos estos acontecimientos terminan en la modulación de la transmisión sináptica excitatoria en los sitios pre-, post- y extrasinápticos por mediadores gliales [199], [218], [219]. Además, al igual que la microglía, los astrocitos activados también son capaces de secretar enzimas MMP [220].

Dado que los astrocitos están interconectados formando un sincitio, los efectos de su reactividad pueden propagarse a distancias considerables, afectando áreas del SNC alejadas del foco de la lesión o enfermedad [219], [221].

Las citoquinas proinflamatorias derivadas de microglía y astrocitos reactivos son responsables de varios mecanismos que contribuyen a la sensibilización central (Figura 4). TNF- α es conocido por su capacidad de aumentar la transmisión sináptica glutamatérgica mediada por GluR1-AMPA en la lámina II del asta dorsal. Asimismo, TNF- α incrementa la actividad del receptor NMDA mediante la fosforilación de ERK en las neuronas, induciendo así un aumento de las corrientes excitadoras y suprime los potenciales de acción en las neuronas inhibitorias GAD67+ en la lámina II del asta dorsal [199]. Otro efecto directo del TNF- α es que activa cascadas de síntesis y liberación de otras citoquinas en el SNC, promoviendo la comunicación cruzada entre las neuronas y las células gliales para afectar la señalización sináptica y aumentando la eficiencia de la transmisión del dolor. Todos estos efectos del TNF- α contribuyen a la inducción y mantenimiento de la hipersensibilidad al dolor [199], [222]. La IL-1 β induce la fosforilación de la subunidad NR1 en las neuronas de la lámina II, permitiendo que la D-serina astrocítica aumente las corrientes excitadoras mediante su unión al sitio de glicina de los receptores de NMDA. Finalmente, las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β también provocan neuroplasticidad a largo plazo en el circuito del dolor al inducir la fosforilación del factor de transcripción de unión al elemento de respuesta AMPc (*cAMP response element-binding*, CREB), lo que conduce a la transcripción de genes de proteínas pronociceptivas en las neuronas del asta dorsal. [199].

MITOCONDRIA Y DOLOR

Las mitocondrias son organelos que poseen dos membranas, la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), la cual presenta múltiples pliegues en forma de crestas. El espacio entre ambas membranas se denomina espacio intermembranoso, mientras que la MMI delimita un compartimento acuoso conocido como matriz mitocondrial. En la matriz se encuentra el ADN mitocondrial, así como los complejos de transcripción y traducción, lo que permite a las mitocondrias sintetizar parte de sus propias proteínas [223].

Las mitocondrias juegan un rol central en el metabolismo aeróbico de las células eucarióticas. Además de ser el lugar principal de producción de ATP, es el sitio donde se produce el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos. Las mitocondrias también actúan en la termogénesis, síntesis de esteroides, homeostasis del calcio y la apoptosis. Para el sistema nervioso, constituyen la principal fuente de energía celular, y por lo tanto resultan cruciales por su alta demanda energética [224], [225], [226].

La glucosa constituye la principal fuente de energía para las células nerviosas [227]. A través del proceso de glucólisis, la glucosa se descompone en piruvato, el cual ingresa a la mitocondria y se transforma en acetil-CoA mediante la acción del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (*Pyruvate dehydrogenase complex*, PDC) [228] alimentando al ciclo de Krebs y generando compuestos de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), flavín adenín dinucleótido (FADH₂) y guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*, GTP), mientras que se libera dióxido de carbono (CO₂). Los productos generados durante este ciclo transfieren electrones hacia la cadena de transporte de electrones ubicada en la MMI, que consisten en los siguientes complejos enzimáticos: complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo b y c1), complejo IV (citocromo oxidasa) y complejo V (la ATP sintasa) [229]. El transporte de electrones por los distintos complejos de la cadena respiratoria libera energía acoplada a la salida de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso a través de los complejos I, III y IV.. De esta forma se genera un gradiente electroquímico o potencial de membrana mitocondrial (ΔpH), creando una fuerza proton-motriz que permite el reingreso de protones a la matriz mitocondrial a través del complejo de la ATP sintasa F1/F0, produciendo la síntesis de ATP (Figura 5) mediante el proceso de fosforilación oxidativa. El ΔpH refleja entonces el estado de acople y síntesis de ATP de la mitocondria [229].

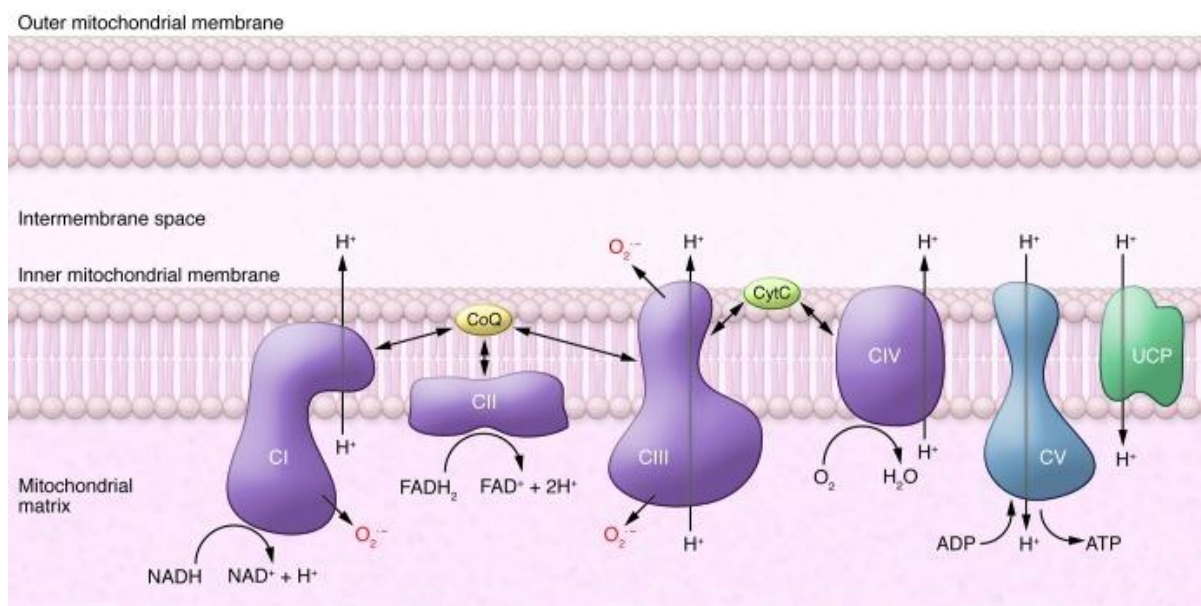


Figura 5. Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial y del sistema de fosforilación oxidativa. El ATP se genera mediante fosforilación oxidativa realizada por los cuatro complejos (CI-CIV) y la ATP sintasa (CV) ubicada en la membrana mitocondrial interna. La energía liberada por la transferencia de electrones del NADH y FADH₂ al O₂ se utiliza para bombear protones (H⁺) a través de CI, CIII y CIV. El gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna impulsa la producción de ATP a través de la ATP sintasa. Extraído de Bratic y Larsson. 2013, [230].

Debido a que la fosforilación oxidativa está acoplada a la cadena de transporte de electrones, el incremento en la velocidad de la fosforilación oxidativa se refleja por un aumento en el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y, por lo tanto, del consumo de oxígeno. La respirometría mitocondrial es la medida del consumo de oxígeno, en presencia de sustratos respiratorios, adenosín difosfato (*Adenosine diphosphate*, ADP). Utilizando inhibidores específicos de los complejos, como el inhibidor del complejo V oligomicina y el agente desacoplante carbonil-cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (*Carbonyl-cyanide-p- trifluoromethoxyphenylhydrazine*, FCCP) se puede evaluar el grado de acople entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP [231], [232].

El flujo de electrones en la cadena respiratoria se asocia a la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERONs), tales como superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxinitrito (ONOO⁻). Esto hace de las mitocondrias una de las principales fuentes de estrés oxidativo en las células [233], [234]. No obstante, las mitocondrias poseen sistemas de detoxificación (defensas antioxidantes) como las enzimas superóxido dismutasa (SODs) (para el superóxido), la glutatión peroxidasa (GPX) (para el peróxido de hidrógeno) y las peroxirredoxinas (Prx) 3 y 5 (para el peróxido de hidrógeno y el

peroxinitrito). Las ERONs que escapan a los sistemas de detoxificación, pueden dañar al ADN o a las proteínas mitocondriales lo cual altera la función bioenergética de las mitocondrias [235].

Además, las mitocondrias a través de la función energética regulan una serie de eventos celulares que determinan la transformación celular hacia un fenotipo proliferativo o a la degeneración por vía de apoptosis [236].

Si bien la oxidación del piruvato en la mitocondria da lugar a una producción significativa de ATP, el metabolismo de la glucosa puede concluir en la glucólisis en el citosol, donde el piruvato se convierte en lactato. Aunque este proceso genera una menor cantidad de moléculas de ATP, su velocidad es considerablemente mayor. El destino final de la glucosa depende en parte del control del PDC, cuya actividad es inhibida por fosforilación de la subunidad E1 α de su enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) a través de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (*Pyruvate dehydrogenase kinase*, PDK), impidiendo la oxidación mitocondrial del piruvato y desviando hacia la vía glucolítica [228]. Este cambio en la bioenergética celular, llamado reprogramación metabólica, que ha sido extensamente descrito en cáncer [237], recién comienza a identificarse en las enfermedades neurodegenerativas como la ELA [238] y en estados asociados al dolor crónico [239]. A su vez, evidencias recientes muestran una interacción entre la reprogramación metabólica y los procesos inflamatorios en condiciones patológicas [240], [241]. Las células que participan de la respuesta inflamatoria experimentan diversos cambios metabólicos, incluyendo un aumento en la captación de glucosa y glucólisis. A su vez el metabolismo alterado puede participar en señalizaciones que promueven o inhiben la inflamación [242]

La heterogeneidad del tejido nervioso se refleja en la diversidad de perfiles metabólicos de sus diversas poblaciones celulares, los cuales están influenciados por el microambiente tisular que las rodea [243], [244], [245], [246].

Se ha propuesto que el metabolismo de la glucosa en el tejido nervioso se lleva a cabo de forma compartimentalizada, lo que implica que las neuronas y las células glía poseen funciones metabólicas diferenciadas, adecuadas a sus necesidades específicas [240], [241], [247]. En condiciones fisiológicas los astrocitos presentan un metabolismo predominantemente glucolítico, mientras que las neuronas recurren a la oxidación de glucosa a CO₂ en las mitocondrias [242], [243], [248]. De esta forma ocurre un acoplamiento metabólico entre estas células donde los astrocitos, mediante la glucólisis, proveen de lactato a las neuronas, el cual actúa como sustrato para el ciclo de Krebs, estimulando la fosforilación oxidativa [240], [245], [247].

La preferencia de los astrocitos por la vía glucolítica se atribuye, entre otros factores, a los altos niveles de expresión de la 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (*6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3*, Pfkfb3), una enzima que favorece esta ruta metabólica [249], [250], [251]. Sin embargo, esta enzima es inestable en las neuronas debido a la continua degradación proteasomal mediada por el complejo promotor de anafase/ciclosoma-Cdh1 (anaphase-promoting complex-Cdh1, APC/C-Cdh1) [251]. Esto resulta en una capacidad reducida de las neuronas para activar la glucólisis tras la inhibición de la fosforilación oxidativa [249]. Un condicionante adicional importante en la determinación del perfil glucolítico de los astrocitos, es la regulación en los niveles de expresión y actividad del PDC [241]. Se ha constatado que todas las subunidades del PDC están presentes en astrocitos y neuronas; no obstante, los astrocitos muestran niveles de inmunorreactividad significativamente superiores para todas las subunidades, en particular de PDK2 y PDK4, en comparación con las neuronas [241]. Esto es consistente con un estado de fosforilación de la PDH elevado, una actividad del PDC reducida y una producción de lactato aumentada en los astrocitos [240], [241]. A pesar de esto, la abundante presencia de mitocondrias en los procesos finos de los astrocitos sugiere un papel fundamental del metabolismo oxidativo mitocondrial, además de las vías glucolíticas, como fuentes de generación de energía en estas células [252]. No obstante, este escenario se ve alterado en condiciones patológicas, en las cuales la reactividad de los astrocitos incluye modificaciones de su metabolismo [253]. Su flexibilidad metabólica permite que, a diferencia de las neuronas que dependen principalmente de la fosforilación oxidativa para su suministro energético, los astrocitos pueden operar de manera eficiente sin esta última, con la capacidad de modificar su perfil metabólico, ajustando la actividad respiratoria mitocondrial en función de las circunstancias ambientales [243], [245], [248]. La reprogramación metabólica de los astrocitos reactivos implica un incremento en la glucólisis, mediado por el aumento en la expresión de enzimas glucolíticas, como es el caso de Pfkfb3 [253]. Asimismo, la adaptación del metabolismo energético en estas células induce alteraciones mitocondriales con una notable disminución en la fosforilación oxidativa, evidenciada por una reducción en el acoplamiento mitocondrial, tasas disminuidas de consumo de oxígeno y fragmentación de la compleja red mitocondrial [254], [255], [256]. Interesantemente, en la médula espinal de animales con hiperalgesia inducida por morfina, se ha reportado una reducción en la actividad de PDC en astrocitos reactivos, mediada por el incremento en los niveles de expresión de la isoforma PDK4, así como por el consiguiente aumento en los niveles de pPDH [257].

De manera similar a los astrocitos, la microglía presenta una notable flexibilidad metabólica. Recientemente se ha demostrado que sus diferentes fenotipos están estrechamente asociados con distintas vías metabólicas [252], [258]. Numerosos estudios de

transcriptómica han evidenciado que estas células transcriben la mayoría de los genes requeridos para la fosforilación oxidativa y la glucólisis, con preferencia por el metabolismo oxidativo de la glucosa en su fenotipo homeostático [250], [259], [260], [261]. Sin embargo, la estimulación proinflamatoria de la microglía induce la transición del metabolismo energético, que pasa de la fosforilación oxidativa a la glucólisis [258]. Frente a estos estímulos, la microglía cultivada adopta un fenotipo reactivo, incrementando así la producción de lactato, mientras que se observa una reducción en el consumo de oxígeno mitocondrial y en la producción de ATP. [262], [263]. De manera consistente, los estímulos antiinflamatorios en la microglía reactiva incrementaron la tasa de consumo de oxígeno, la respiración basal y la producción de ATP [264].

Estos cambios en el metabolismo energético, caracterizados por niveles reducidos de fosforilación oxidativa y una síntesis de ATP a través de la vía glucolítica, han sido observados en diversas alteraciones al SNC. [265]. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio revelaron que las células gliales obtenidas de animales transgénicos que sobreexpresan la SOD1 humana con la mutación G93A asociada a la ELA familiar presentan un metabolismo energético caracterizado por una reducción en la respiración mitocondrial y un aumento en la liberación de lactato [254]. Es relevante destacar que esta alteración metabólica se asoció con una disminución en la capacidad trófica de estas células hacia las motoneuronas, lo cual resultó en la apoptosis neuronal. En dichos estudios, utilizamos dos estrategias para aumentar la función respiratoria mitocondrial en las glías SOD1G93A: la administración de antioxidantes dirigidos a la mitocondria como la mitoquinona (MitoQ), y la modulación del metabolismo con DCA, un organohaluro que ha sido utilizado para el tratamiento de mitocondriopatías en humanos [266]. Este último inhibe específicamente a la enzima PDK, manteniendo a la PDH en su estado desfosforilado y catalíticamente activo, facilitando la oxidación aeróbica de la glucosa, favoreciendo el aporte de sustratos al ciclo de Krebs y en consecuencia estimula la actividad mitocondrial [266], [267] (Figura 6). El tratamiento con MitoQ en ratones portadores de la mutación SOD1G93A, redujo la muerte de motoneuronas en la médula espinal y mejoró el desempeño motor de los animales [268]. Asimismo, el tratamiento con DCA también demostró ser beneficioso en los ratones [269], indicando que el restablecimiento del nivel de consumo de oxígeno mitocondrial modifica los mecanismos que llevan a la muerte neuronal en modelos de ELA. Estos estudios sugieren que la "disfunción mitocondrial" podría ser reversible y probablemente sea consecuencia de una adaptación a la patología, mediada a través de la reprogramación del metabolismo energético [238]. Dichos datos soportan la idea de que el cambio en el metabolismo que pueden sufrir las células gliales frente al daño puede ser revertido por distintas estrategias dirigidas a la mitocondria.

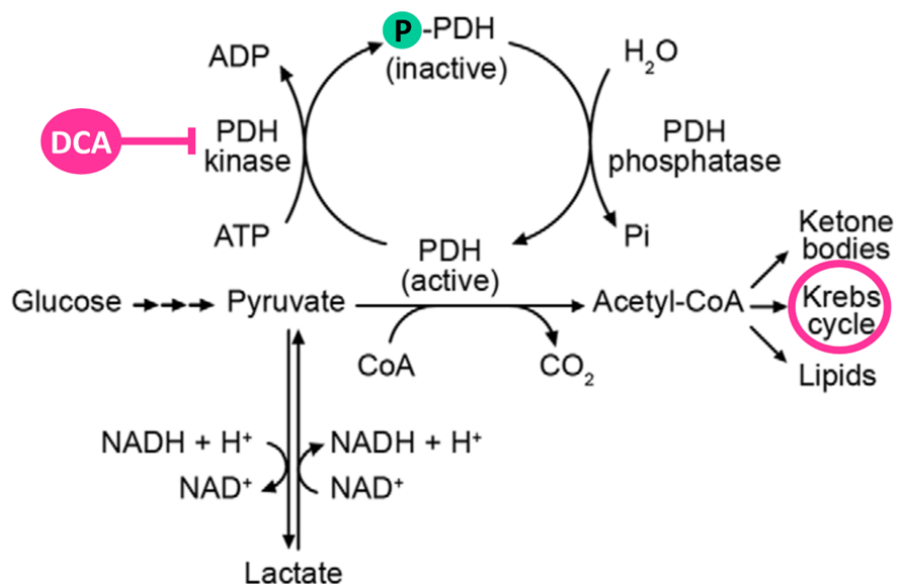


Figura 6. Sitio de acción del dicloroacetato. El DCA inhibe a la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), manteniendo así a la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) en su estado desfosforilado y catalíticamente activo, lo que facilita la oxidación aeróbica de la glucosa. Extraído de Miquel et al., 2012 [269].

A pesar de las abundantes evidencias de la participación de la función mitocondrial en varios desórdenes del SNC [254], [268], [269], [270], [271], [272], el rol de la función mitocondrial en el procesamiento sensorial y el dolor no se ha explorado hasta hace poco tiempo. Un reciente relevamiento en personas con deficiencia mitocondrial hereditaria ha reportado que el 70% de estas población experimentan dolor crónico [273], indicando una posible relación entre la disfunción mitocondrial y el desarrollo del dolor crónico. Las evidencias de un compromiso mitocondrial en pacientes o en modelos animales de dolor incluyen alteraciones en la ultraestructura mitocondrial, en el consumo de oxígeno, en el ΔpH , así como en la producción de ERONs y de ATP [274], [275], [276], [277], [278]. Además, se ha observado que las neuropatías periféricas están asociadas a daños mitocondriales en los nervios periféricos. Esta idea se sustenta en estudios que muestran que la respiración mitocondrial y la producción de ATP está disminuida en modelos de neuropatías en ratas inducidas por agentes quimioterapéuticos [275]. Evidencias similares se han acumulado en otras neuropatías periféricas evocadas por diabetes o VIH [279], [280]. Asimismo, estudios en animales con modificaciones genéticas en el complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en neuronas sensoriales primarias

provocan deficiencias energéticas en estas neuronas, lo que resulta en hipersensibilidad al dolor [281]. Sin embargo, casi no existen reportes de la actividad mitocondrial a nivel de la médula espinal u otras regiones del SNC involucradas en la vía del dolor. En este sentido, se han reportado alteraciones en la distribución de las mitocondrias en neuronas de las láminas I y II del asta dorsal en modelos de dolor inflamatorio y neuropático [282]. Un estudio más reciente en animales con dolor inducido por la droga quimioterapéutica vincristina reportó, en la médula espinal, un aumento en la producción de ERONs y alteraciones en la ultraestructura de estos organelos [283]. A pesar de estos hallazgos, estos estudios no aportan información sobre la función respiratoria mitocondrial. Asimismo, no hay suficientes reportes que indiquen que la modulación de la función mitocondrial afecte la hiperalgesia o alodinia que se ve en animales sometidos a dolor crónico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Proponemos que la reactividad glial que ocurre en la médula espinal en situaciones de dolor crónico se asocia a alteraciones en la función respiratoria mitocondrial, lo cual impacta en la generación de la hiperalgesia y alodinia.

La modulación metabólica mediante el tratamiento con DCA disminuirá la reactividad glial y afectará el comportamiento asociado al dolor. Además, impactará en la distribución de las redes perineuronales y la expresión de marcadores sinápticos asociados a la sensibilización central.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es estudiar la función mitocondrial en la médula espinal de animales sometidos a dolor crónico, y analizar los efectos de la administración oral del modulador metabólico DCA sobre la reactividad glial, la hiperalgesia, y la alodinia. Además, evaluar la relación entre la función mitocondrial y los mecanismos de sensibilización central en la médula espinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la actividad respiratoria mitocondrial en la médula espinal de animales con dolor crónico.
2. Analizar el efecto de la modulación metabólica por DCA sobre la respiración mitocondrial y la reactividad glial en la médula espinal de los animales afectados por dolor crónico.
3. Evaluar la hiperalgesia y/o alodinia que caracterizan a los modelos de dolor crónico frente al tratamiento con DCA.
4. Estudiar las modificaciones inducidas por DCA en la MEC y los marcadores sinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley (de entre 200 y 250 g de peso en el momento de la inyección) y ratones machos adultos C57BL/6 (de entre 25 a 30 g de peso en el momento de la lesión), adquiridos y mantenidos en la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina o en la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio del Instituto Pasteur de Montevideo siguiendo los lineamientos de la Comisión Europea sobre Cuidado Animal y Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio [35]. Todos los procedimientos experimentales y quirúrgicos utilizados, fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA; <https://chea.edu.uy/>) (Comisión Honoraria de Experimentación Animal); protocolo # 070153-000528-14 y # 070153-000651-19; y el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto Pasteur de Montevideo. Los animales se alojaron en un ambiente controlado (ciclo luz-oscuridad de 12 horas; 20 ± 1 °C), con acceso al alimento y agua *ad libitum*.

El número total de ratas utilizadas fue de 52 animales inyectados y 12 animales sin intervenir (naïve). En el caso de los ratones, se utilizaron 48 animales lesionados y 31 animales naïve. El detalle del n para cada experimento se indica en la leyenda de la figura correspondiente.

INYECCIÓN PLANTAR DE ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND

Se realizó en ratas macho adultas Sprague-Dawley. Los animales recibieron una inyección subcutánea de 50µl de Adyuvante Completo de Freund (ACF, 1µg/µl, Sigma #F5881) en la planta del miembro posterior derecho. La inyección local de ACF provoca edema en el miembro inyectado además de hiperalgesia local desde el primer día tras la inyección y durante 13 días [40].

Este modelo, es ampliamente utilizado en la literatura, y el dolor generado no resulta paralizante para el animal [40], [284].

CONSTRICCIÓN CRÓNICA DE NERVIOS CIÁTICOS

Se realizó una constricción crónica del nervio ciático (CCI) [43] en ratones machos adultos C57 BL/6. Brevemente, los animales fueron anestesiados con Ketamina (90 mg/kg) - Xilazina (10 mg/ kg) intraperitoneal a una dosis de 0,6 ml cada 100 g peso. Luego se procedió a exponer el nervio ciático, a la altura de la mitad del muslo y libre de tejido adherido. Se realizaron tres ligaduras con hilo de sutura (mononylon Ethilon 5-0; Ethicon) alrededor del nervio con un intervalo de aproximadamente 1 mm entre cada una. La herida fue cerrada y desinfectada. Después de la cirugía, los animales se recuperaron sobre una manta térmica a 27°C. En todos los animales la lesión se realizó en el miembro posterior derecho, salvo aquellos destinados a los estudios de respirometría de alta resolución, en cuyo caso la lesión se realizó en ambas extremidades posteriores.

ADMINISTRACIÓN DE DICLOROACETATO

Para ambos modelos de dolor, los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos, uno de los cuales recibió en el agua de beber DCA (500 mg/L, Sigma #347795-50G) a partir del día de la inyección o lesión y hasta el término del estudio, y el otro recibió solo agua (vehículo). La solución se preparó fresca dos veces a la semana como se indica previamente [254], [269]. En ambos modelos los animales reservados a las pruebas comportamentales, a ensayos de respirometría, extracción de proteínas y ARN, completaron un tratamiento de 13 días en el modelo de dolor inflamatorio (Figura 7A) y 19 días en el modelo de dolor neuropático (Figura 7B). Para aquellos destinados a estudios de inmunofluorescencia, se sacrificaron animales en diferentes intervalos de tiempo luego de la inyección de ACF (días post inyección, dpi) o lesión por CCI (días post lesión, dpl) a los efectos de evaluar el curso temporal de la reactividad glial (Figura 7).

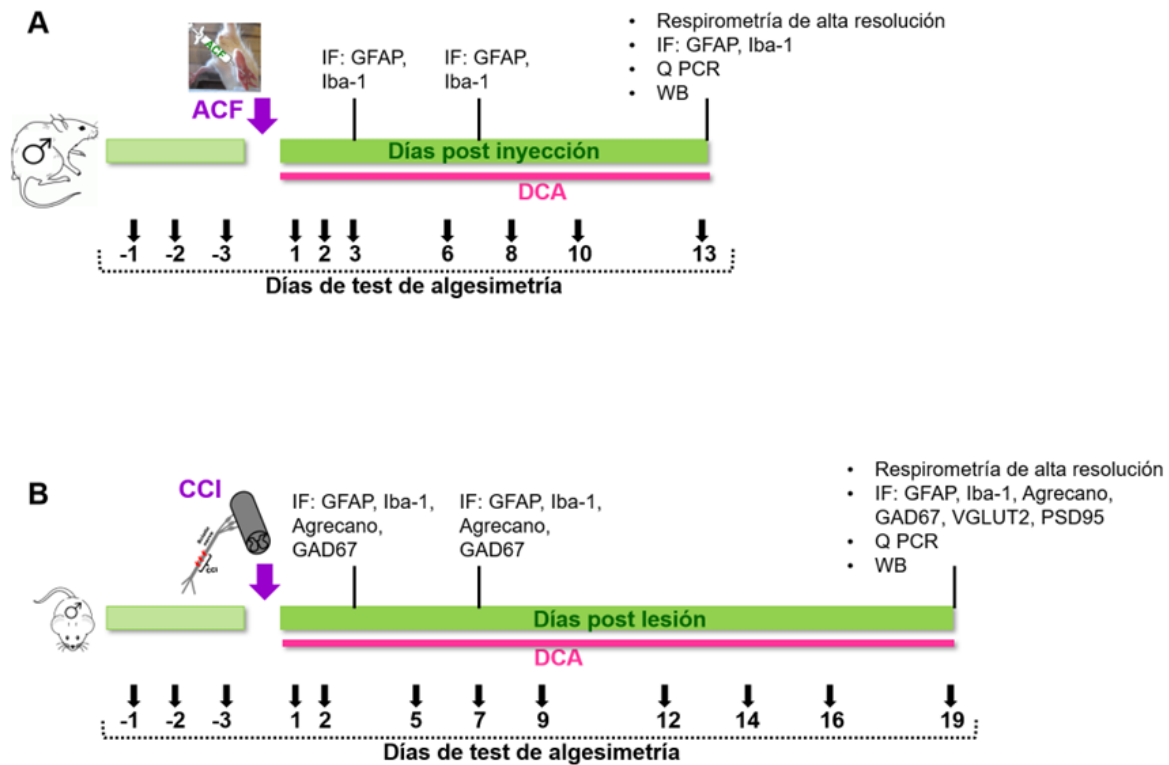


Figura 7. Diseño del trabajo experimental. A-B) Esquema resumido de los protocolos aplicados a los animales (ratas macho) del modelo de dolor inflamatorio por inyección intraplantar de Adyuvante Completo de Freund (ACF) (A), y a los animales (ratones machos) del modelo de dolor neuropático por constricción crónica del nervio ciático (CCI) (B). Las líneas horizontales verdes corresponden a los cursos temporales de los dos estudios. Las flechas violetas indican el día 0, en el que se realizó la injuria. Las líneas horizontales rosadas representan el período durante el cual se administró DCA. Las flechas negras especifican los días en los que se realizaron los test de algiesimetría para evaluar la alodinia mecánica y / o hiperalgesia térmica. Las líneas verticales negras indican los días en los cuales se realizaron los ensayos indicados, además de registrar el peso corporal y medir las dimensiones de la extremidad posterior lesionada. IF, Inmunofluorescencia; GFAP, proteína ácida glial fibrilar; Iba-1, molécula adaptadora de unión de calcio ionizado-1; GAD67, glutamato descarboxilasa-67; VGLUT2, transportador vesicular de glutamato-2; PSD95, proteína de densidad postsináptica-95; Q PCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; WB, western blot.

EVALUACIÓN SENSORIAL

TEST DE ALGESIMETRÍA TÉRMICA

Las latencias de retirada de la extremidad posterior al calor se determinaron aplicando un algiesímetro estándar (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA) basado en el método de Hargreaves [285]. Los animales se colocaron en cajas acrílicas individuales sobre una superficie de vidrio templado, se colocó una fuente de calor radiante debajo de cada una de las extremidades posteriores y se registró la latencia de retirada (tiempo en segundos que

demora el animal en retirar la extremidad luego del estímulo). Se estableció una latencia límite de 20 segundos para evitar daños en los tejidos. Se registraron tres mediciones que se promediaron para obtener el valor de latencia de cada extremidad.

TEST DE ALGESIMETRÍA MECÁNICA

Para la evaluación de la alodinia táctil mecánica se utilizaron los filamentos de Von Frey (MARSTOCK nerve test) [286]. Dichos filamentos son fibras de nylon flexibles de diferentes diámetros y calibrados que al aplicarse sobre una superficie ejercen niveles de fuerza definidos. Los animales se colocaron en cubículos acrílicos con una rejilla en su base que permitió el acceso completo a las patas y se dejaron aclimatar durante 15 minutos. Se utilizaron un conjunto de 9 filamentos de fuerza logarítmicamente ascendente (Tabla 1). Las fibras se aplicaron sobre la superficie plantar de manera perpendicular con suficiente fuerza hasta causar un ligero pandeo. La fuerza se mantuvo durante 8 segundos y se determinó si el animal retira o no la extremidad posterior en respuesta al dolor. Las respuestas consideradas positivas fueron: retirada brusca de la extremidad posterior, lamida de la extremidad posterior o vocalización. Todos los ensayos se comenzaron aplicando un mismo estímulo inicial, que en condiciones normales generó una respuesta umbral. Los estímulos posteriores se presentaron dependiendo de la respuesta anterior, con intervalos de varios minutos, por el método “up-down” de Dixon [286], [287]. En ausencia de una respuesta de retirada de la extremidad posterior al filamento seleccionado inicialmente, el siguiente estímulo que se presenta es el inmediato más fuerte; por el contrario, ante una respuesta positiva frente a un filamento, se elige como estímulo siguiente al filamento inmediato más débil. La cantidad de estímulos presentados fueron de 5 a 9 dependiendo de la respuesta del animal. El patrón resultante de respuestas positivas y negativas se tabuló utilizando la convención, X = respuestas positivas; 0 = respuestas negativas [286]. Basado en el patrón de respuesta y la fuerza del último filamento ejercido se calculó el UMBRAL DE RESPUESTA DEL 50% O LD (dosis letal) 50%, estímulo mínimo requerido para provocar el 50% de las respuestas positivas (umbral de dolor), con la siguiente ecuación[286], [287]:

$$LD50\% = 10^{(X_f + k\delta)}$$

Donde X_f es el Log10 (Peso de la última fibra), K es el valor de tabla según patrón de respuesta pos/neg y δ es el promedio de las diferencias logarítmicas de los pesos en gr de las fibras utilizadas[286], [287].

Tabla 1. Serie de filamentos Von Frey utilizada.

Filamentos von Frey	
N° de Filamento	Fuerza ejercida (gramos)
15	3.26
16	4.62
17	6.52
18	9.23
19	13.00
20	18.50
21	26.10
22	36.90
23	52.20

EVALUACIÓN DEL EDEMA Y PESO CORPORAL TRAS LA INYECCIÓN DE ADYUVANTE COMPLETO DE FREUD

En cada extremidad posterior, con un calibre, se midió el eje mayor, distancia entre la articulación tibiotarsal; eje menor, distancia a nivel de las almohadillas medias; y espesor, medido al mismo nivel que el eje menor en los -1, 1, 3, 8 y 13 dpi (Figura 8). Estos datos se utilizaron para calcular el volumen de un prisma rectangular que se tomó como representativo del volumen de la región a evaluar.

Adicionalmente, se llevó a cabo un seguimiento del peso corporal de los animales a lo largo del estudio, realizando las mediciones en los 0, 2, 3, 7, 9 y 13 dpi.

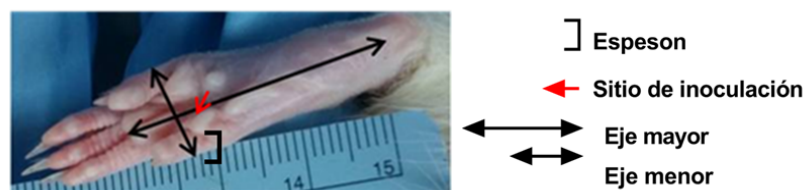


Figura 8. Medición del volumen de la extremidad posterior. La flecha roja indica el sitio de inyección con ACF. Las flechas negras muestran el eje mayor y menor, y el corchete indica el espesor utilizado para el cálculo del volumen de dicha extremidad.

RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN

La medida del consumo de oxígeno mitocondrial en muestras de médula espinal se realizó en un oxímetro de alta resolución Oroboros oxygraph 2k tal como se indica en la literatura [288].

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y rápidamente se procedió a obtener muestras de segmentos lumbares de la médula espinal (L4-6). Los segmentos de la médula espinal L4-6 de las ratas del modelo de dolor inflamatorio se seccionaron en mitades ipsi y contralateral a la inyección (Figura 9A). En el caso de los ratones con dolor neuropático, se usaron los segmentos completos de la médula espinal L4-6 (Figura 9B). Las muestras, de entre 5 a 8 mg, se permeabilizaron con saponina (50 mg/ml) en medio de respiración mitocondrial MIR05 (0.5 mM EGTA, 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60 mM MOPS, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM sacarosa, 1 g/L BSA, pH 7.1) durante 10 minutos. Luego se enjuagaron en medio de respiración mitocondrial MIR05 y se colocaron en cámaras 2,2 ml del Oroboros oxygraph 2k a 37°C [289], [290].

Se calculó el consumo de oxígeno por mg de tejido ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) usando el software de análisis DatLab 4. El ensayo se inició con la adición del sustrato de la cadena de transporte de electrones succinato (10 mM), seguido por ADP (1 mM) y posteriormente se agregó el inhibidor del ATP sintasa complejo V oligomicina (2 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Figura 9C). Luego se tituló con FCCP (0,05 μM y 0,5 μM), y se finalizó con la adición del inhibidor del complejo III, antimicina A (0,75 mM) (Figura 9C) [289].

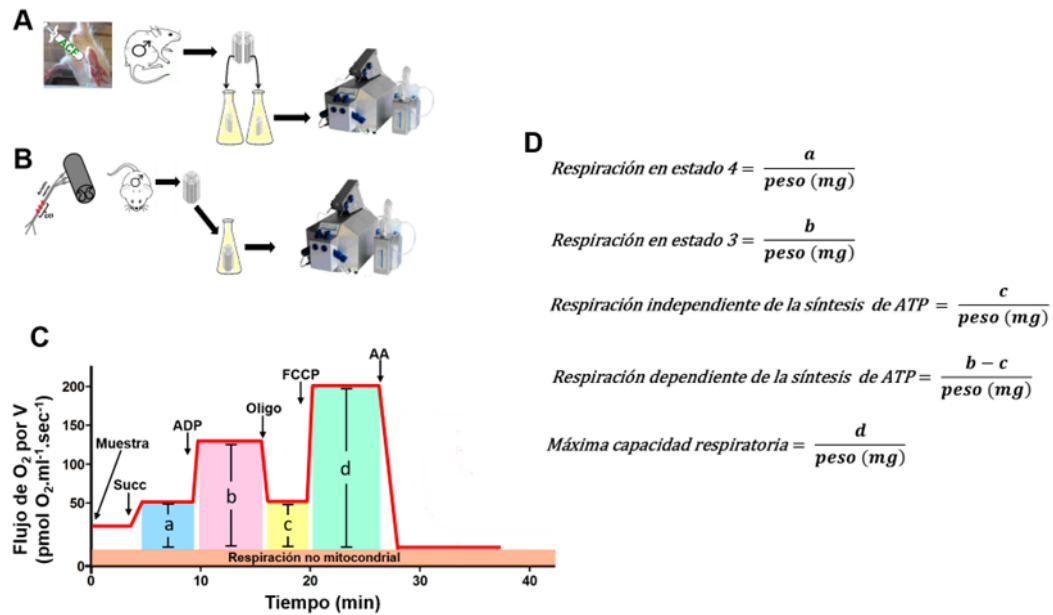


Figura 9. Análisis por respirometría de alta resolución. A-B) Esquemas de las biopsias utilizadas para evaluar la función mitocondrial en el modelo de dolor inflamatorio (A) y neuropático (B). **C)** Bosquejo gráfico representativo del protocolo de respirometría de alta resolución y las pendientes obtenidas después de la adición de: succinato (Succ) (a); adenosín difosfato (ADP) (b); oligomicina (Oligo) (c); titulación con Carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (d); Antimicina A (AA) (Respiración no mitocondrial), que se restó de todos los valores. **D)** Fórmulas para el cálculo de los parámetros respiratorios a partir de las pendientes obtenidas.

Después del ensayo de función mitocondrial, se determinaron los siguientes parámetros como se describió anteriormente [288], [289]: respiración en el estado 4 (después de la adición de succinato), respiración en el estado 3 (después de la adición de ADP), respiración independiente de la síntesis de ATP (respiración resistente a oligomicina), respiración dependiente de la síntesis de ATP (sensible a la adición de oligomicina, destinada a la síntesis de ATP, obtenida restando la respiración independiente de ATP a la respiración del estado 3) y máxima capacidad respiratoria (valor de consumo más alto obtenido después de la titulación de FCCP) (Figura 9D). La respiración no mitocondrial, obtenida después de la inhibición del complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial por antimicina A, se restó de todos los parámetros.

PROCESAMIENTO PARA INMUNOFLUORESCENCIA

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (25mg/ml) a una dosis de 50 mg/kg, y luego fijados por perfusión transcardíaca con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en PBS 1X. Se disecó la médula espinal lumbar y se postfijó 24 horas en el mismo fijador. Las muestras fueron crioprotegidas (sacarosa 30% en PBS) y se obtuvieron cortes transversales de 30 μ m en un crióstato LEICA CM1850uv a -21°C de la Unidad de Procesamiento Morfológico del Departamento de Histología y Embriología. Dichos cortes se recolectaron en 8 tubos de 1.5 ml con solución de criopreservación OLMOS, y mantenidos a -20°C hasta su utilización. En cada tubo se colocaron cortes de cada uno de los niveles entre L4-L6 para que fueran réplicas representativas.

Las técnicas de inmunofluorescencia se realizaron en cortes en flotación. En primer lugar, se realizaron tres lavados de 10 minutos en agitación con PBS 1X, de manera de remover la solución de OLMOS. Seguidamente, los cortes fueron permeabilizados con 0,2 % de tritón X-100 en PBS a temperatura ambiente por 20 minutos e incubados, en iguales condiciones, en solución de bloqueo (10% de suero de cabra, 2% de albúmina sérica bovina, 0,1% de tritón en PBS) durante 1 hora. Pasado este tiempo, los cortes se incubaron toda la noche en agitación con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (10% de suero de cabra, 2% de albúmina sérica bovina, 0,1% de tritón en PBS) a 4°C. Los cortes destinados a detectar células gliales se incubaron con los anticuerpos anti-GFAP (ratón, 1:500, Sigma #G3893) y anti-Iba-1 (conejo, 1:1000, Wako Chemicals #019-19741). En cuanto a la detección de los elementos de la MEC, se utilizó anti-Agrecano (conejo, 1:500, Sigma #AB1031). Para el reconocimiento de las pre y postsinapsis glutamatérgicas se utilizaron los anticuerpos primarios anti-VGLUT2 (ratón, 1:500, Synaptic Systems #135 421) y anti-PSD95 (conejo, 1:300, Abcam #ab18258). Para el caso de los cortes utilizados en el análisis de las presinapsis GABAérgicas se usó el anticuerpo anti-GAD67 (ratón, 1:500, Sigma #MAB5406). Al día siguiente se procedió a realizar tres lavados sucesivos de 10 minutos en agitación con PBS 1X y posteriormente los cortes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con los anticuerpos secundarios para el reconocimiento de los correspondientes anticuerpos primarios: anti-conejo conjugado a AlexaFluor⁴⁸⁸ (1:1000, Invitrogen #A11034), anti-ratón conjugado a AlexaFluor⁵⁹⁴ (1:1000, Invitrogen #A11032), anti-conejo conjugado a AlexaFluor⁵⁹⁴ (1:1000, Thermo Fisher Scientific #A-21207), anti-ratón conjugado a AlexaFluor⁴⁸⁸ (1:1000, Thermo Fisher Scientific #A-11001) y estreptavidina conjugado a AlexaFluor⁴⁸⁸ (1:500, Invitrogen #S11223). Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente con PBS 1X. Luego, los cortes se incubaron en agitación con el marcador nuclear DAPI (1 μ g/ml,

Invitrogen #D1306) por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron los últimos tres lavados de 10 minutos en agitación con PBS 1X y los cortes se montaron en PVA-DABCO Solución de montaje para inmunofluorescencia.

En cada situación experimental se incluyeron controles negativos que omitieron los anticuerpos primarios.

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

En todos los casos, las regiones de interés fueron las correspondientes a las láminas I - II del asta dorsal de la médula espinal lumbar L4-6, ipsi y contralateral a la inyección o lesión (Figura 10B). Todas las imágenes se adquirieron con los mismos parámetros de exposición. Para esto, se utilizaron de 2 a 6 animales por grupo, recurriendo a 10 cortes por animal (separados por al menos 300 μ m). Los valores obtenidos de las respectivas cuantificaciones para cada animal, utilizando el software FIJI (NIH), se promediaron de los 10 cortes utilizados. Para los casos en que se consideró pertinente la incorporación de animales naïve, se tomó como ipsi y contralateral a los lados de la médula espinal equivalentes a los de los animales inyectados o lesionados.

En primera instancia, y con el propósito de evaluar la reactividad glial, se empleó un objetivo seco Olympus UPlanFL N 20x/0,50NA en un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX81 acoplado a una cámara digital Olympus DP71, o con un objetivo de inmersión en aceite HCXPL APO 40x/1,25-0,75NA en un microscopio confocal Leica TCS-SP5-II (Leica Microsystems) de la Unidad de Microscopía Confocal y Epifluorescencia de la Facultad de Medicina (UMCE). Luego se cuantificó el área ocupada por la fluorescencia respecto al área total de la región diana mediante el software FIJI (NIH).

Por otro lado, el marcador de MEC y de las terminales postsinápticas GABAérgicas, se visualizaron por microscopia confocal en un microscopio confocal Zeiss LSM880 con un objetivo seco EC Plan-Neofluar 20x/0,50 NA M27 del la Unidad de Bioimagenología Avanzada del Institut Pasteur de Montevideo. De las imágenes obtenidas se cuantificó la intensidad de fluorescencia media de las regiones de interés .

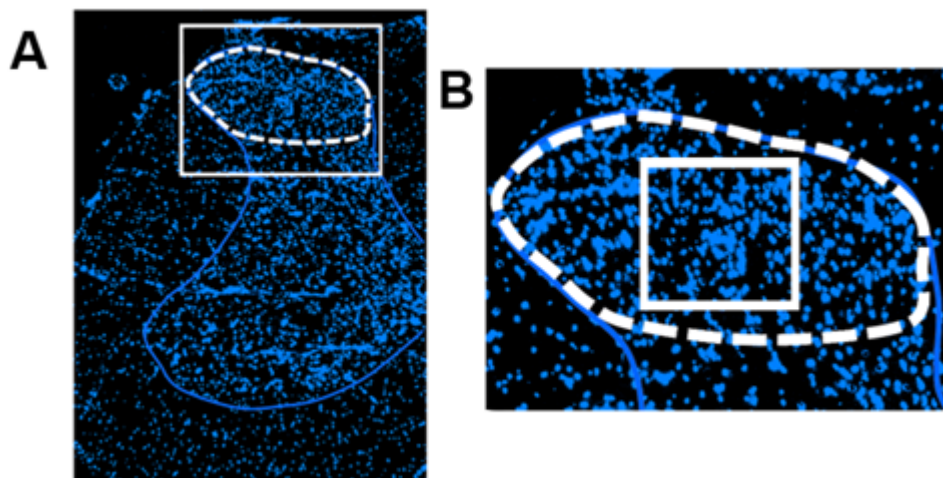


Figura 10. Regiones del asta dorsal de la médula espinal adquiridas con microscopía de epifluorescencia. A) Microfotografía representativa de un corte de médula espinal marcado con DAPI. La línea de puntos rodea el área superficial del asta dorsal de la médula espinal en la que se cuantificó la inmunorreactividad. El cuadrado delimitado con la línea punteada se muestra ampliado en B. **B)** El cuadrado dentro de la línea de puntos indica la región empleada para la adquisición de las imágenes de microscopía de epifluorescencia y confocal.

En cuanto al estudio de los marcadores PSD95 y VGLUT2, se recurrió al uso de un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO 63x/1.40 con un zoom de 3X en un microscopio confocal Leica TCS-SP5-II (Leica Microsystems) de la UMCE. Se obtuvieron grupos de imágenes apiladas (z-stacks) con un paso de 0,21 μm y 9 planos. De cada asta dorsal, ipsi o contralateral, se adquirieron 3 z-stacks (una por cada tercio) de la región que comprende las láminas I – II, resultando en 6 imágenes en total por corte (figura 11A-B y 12A-B). Previo a su cuantificación, los z-stacks de imágenes fueron procesados por deconvolución utilizando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging).

Por un lado, se realizó un procesamiento en tres dimensiones aplicando el complemento 3D Manager del software FIJI (NIH). Con este fin, en dicho software, se creó un programa (Macro) en colaboración con Ernesto Miquel, para automatizar una serie de comandos que permitieron el análisis del número, volumen e Intensidad de fluorescencia media por partícula VGLUT2 o PSD95 positiva por μm^3 (Figura 11C-G). Dicho macro fue guardado como un archivo de texto y posteriormente ejecutado sobre el conjunto total de z-stacks, con los comandos que se detallan a continuación. En primer lugar, se definieron las carpetas de localización de los z-stacks y de almacenamiento de los resultados finales. Cada z-stack se importó al software FIJI (NIH), donde se separaron los canales para luego ser duplicados. A partir de aquí el software trabajó sobre la copia generada, de manera

independiente para cada canal. El z-stack, compuesto por un solo canal (Figura 11C), se sometió a umbralización (Figura 11D). Seguidamente, se abrió el complemento 3D Manager (Figura 11E y G) y se importó el z-stack umbralizado de manera de ser segmentado con el fin de localizar los objetos (Figura 11F). Inmediatamente, se midieron el volumen (en μm^3) y las intensidades medias de fluorescencia (Unidades Arbitrarias) de dichos objetos. Posteriormente, el z-stack analizado se cerró, y las mismas acciones se aplicaron para el otro canal del z-stack correspondiente. Este análisis se repitió en todos los z-stacks obtenidos por microscopía confocal, y finalmente, los resultados se exportaron en formato csv (tamaños e intensidades por separado) a la localización definida inicialmente.

Sumado a lo anterior, se desarrolló un método manual con el propósito de analizar los puntos de contacto entre los marcadores pre y postsinápticos en los z-stacks mencionados anteriormente (Figura 12). La cuantificación se realizó en los planos número 1, 5 y 9 del z-stacks, utilizando cinco regiones de una cuadrícula 3x3 dibujada, con la herramienta correspondiente del software FIJI (NIH), sobre cada uno de estos planos (Figura 12B). De manera manual, utilizando el mismo software, se delimitó el contorno de cada una de las partículas VGLUT2 y PSD95 positivas con píxeles en común. Para ello se tomó en cuenta no solo la superficie ocupada por cada marcador individual (en color rojo o verde) sino que también la de superposición de píxeles (en color amarillo) (Figura 12C). De esta forma, se cuantificó el número de contactos VGLUT2-PSD95, y al mismo tiempo, la intensidad media de fluorescencia de cada uno de los elementos de dichos contactos [291].

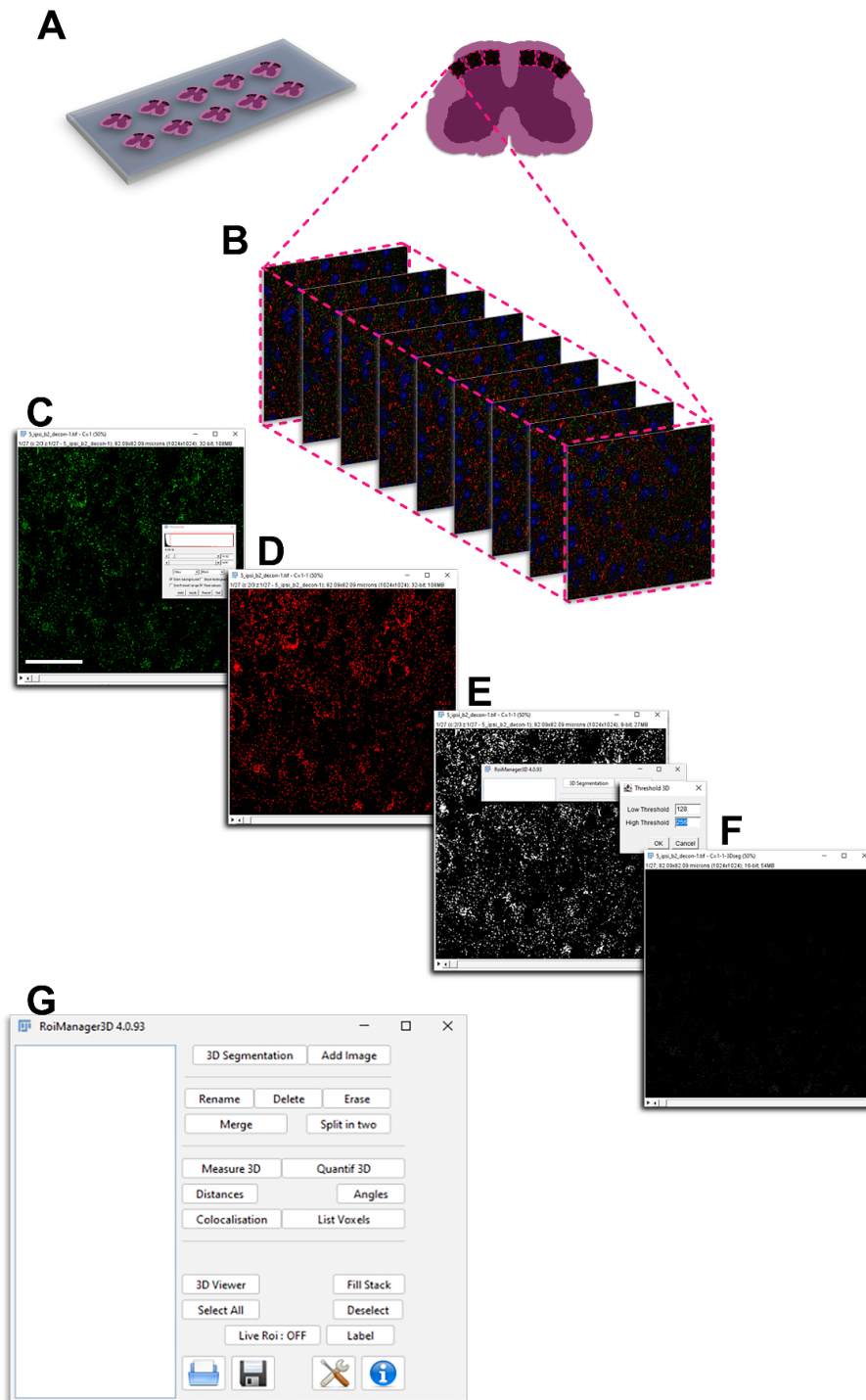


Figura 11. Diagrama del procesamiento de imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias de los marcadores pre y postsinápticos glutamatergicos mediante un macro desarrollado en el software FIJI . **A)** Representación del número de cortes utilizados (10) por animal. En cada asta dorsal de la médula espinal, mostrada a mayor escala a la derecha del dibujo del portaobjetos, se delimitan con líneas puntuadas rosadas tres cuadrados que indican las regiones (láminas I-II) de las cuales se adquirieron los 3 z-staks correspondientes. **B)** Imagen representativa de un z-stak desplegado en los 9 planos que lo constituyen. **C-G)** Esquema de los comandos del macro desarrollado en el software FIJI (NIH): Uno de los z-stak generados luego de la separación de los canales (C); umbralización del z-stak (D); Importación del z-stak umbralizado al complemento 3D Manager (E); segmentación del z-stak realizada en el complemento 3D Manager (F); ventana desplegada del complemento 3D Manager (G).

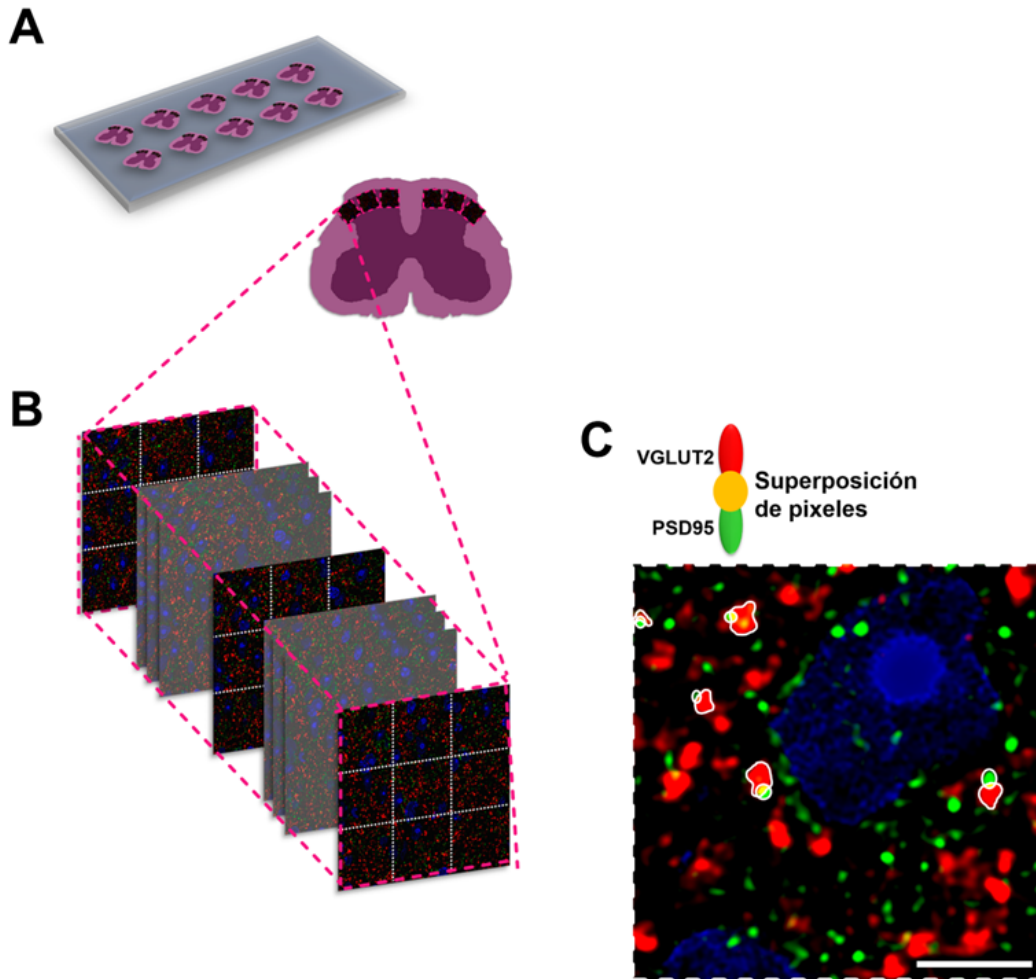


Figura 12. Diagrama del procesamiento de imágenes para el análisis de contactos VGLUT2-PSD95 A) Esquema de las 6 regiones del asta dorsal ipsi y contralateral en donde se adquirieron los z-stacks. B) Z-stacks representativo con sus planos expandidos. Los planos descartados para el análisis se muestran con una tonalidad transparente, mientras que los 3 planos utilizados se observan claramente, cada uno subdivididos con líneas punteadas blancas formando una cuadrícula de 3 x 3. C) Imagen representativa ampliada de una de las 5 regiones de dicha cuadrícula utilizadas para la cuantificación. El color rojo corresponde a VGLUT2, el verde a PSD95 y el amarillo a la región de superposición de ambos. Dentro de la imagen, con blanco se delimitan los contornos de ambos componentes de los contactos VGLUT2-PSD95 para su cuantificación. Escala = 2,5 µm.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA WESTERN BLOT

Los animales se anestesiaron profundamente (pentobarbital, 50 mg/kg intraperitoneal) e inmediatamente se procedió a aislar muestras de médula espinal en hielo a nivel lumbar L4-L6 ipsilaterales a la inyección o lesión, o de animales naïve. Las muestras se homogeneizaron en hielo con un homogenizador eléctrico en 300 µl de buffer de lisis RIPA con ortovanadato de sodio 2 mM durante 3 minutos y luego se sonicaron en hielo por 2 minutos, para finalmente centrifugarse 20 minutos a 4°C y 12.000 RPM.

La cuantificación de las proteínas se realizó por el ensayo de ácido bicinconínico (BCA). Se prepararon diluciones 1/10 de las muestras en H₂O que fueron sembradas por duplicado en una placa p96 con un volumen de 10 µL. En los pocillos reservados al estándar se sembraron en igual volumen, y por duplicado, 8 diluciones seriadas 1/2 de Albúmina de suero bovino 1000 µg/ml. Para el blanco se utilizó H₂O. En todos los pocillos (ocupados por muestra, estándar o blanco) se agregó 200µl de reactivo: 50 partes de BSA y 1 parte de CuSO₄. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos y se midió la absorbancia en un lector de placas con un filtro de 562 nm.

Después de la cuantificación y desnaturalización, todas las muestras se diluyeron en buffer de lisis hasta igualar a una concentración de 2,3 µg/µl, y se resolvieron mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12 % de espesor de 1,5mm. Para ello, se cargaron 5 µl de marcador de peso Molecular (Fermentas pageruler prestained protein ladder, Thermo Scientific #26616) y un volumen de 20 µl (46 µg) de las muestras en buffer de carga 1%. Inicialmente las muestras se corrieron a un voltaje de 85 V hasta que todas entraron en los geles de resolución, luego las corridas se continuaron a 110 V por aproximadamente 3 horas. Seguidamente se realizaron las transferencias a membranas de nitrocelulosa, a 300 mA durante 1 hora y 30 minutos. Con el propósito de comprobar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas se incubaron en Rojo Ponceau (BioReagent #09189-6X1L-F) durante 5 minutos, luego de esto se realizaron los lavados correspondientes con H₂O y se dejaron secar en papel absorbente durante al menos 3 días.

Pasado este tiempo, las membranas se rehidrataron con PBS 1X y se incubaron en agitación en una solución de bloqueo (solución de albúmina 5 % en PBS 1X) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron, a 4 °C durante toda la noche, con los anticuerpos primarios (en solución de albúmina 5 % en PBS-T) anti-PDH-E1a-pSer293 (conejo, 1:500, Calbiochem #AP1062) y anti-PDH-E1a (ratón, 1:500, Invitrogen #456600) o anti-PSD95 (conejo, 1:500, Abcam #ab18258) y anti-VGLUT2 (ratón, 1:800, Synaptic Systems #135 421), dependiendo de las proteínas a detectar. En ambas

situaciones como control de carga se utilizó anti- α tubulina (ratón, 1:3000, Abcam #ab7291; conejo, 1:3000, Abcam #ab176560). Al día siguiente se realizaron cuatro lavados de 10 minutos con PBS-T en agitación y a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron, a temperatura ambiente y en agitación por 1 hora, con anticuerpos secundarios (en PBS 1X) anti-IgG ratón conjugados con IRDye 680RD (1:15000, LI-COR Biosciences #926-68070) y anti-IgG conejo conjugados con IRDye 800CW (1:15000, LI-COR Biosciences #925-32218), para luego finalizar con cuatro lavados de 10 minutos, en agitación y a temperatura ambiente, con PBS-T.

La detección y cuantificación de intensidad de las bandas se realizó con el sistema Odyssey (LI-COR Biosciences). Los niveles relativos de intensidad se normalizaron con sus correspondientes controles de carga y luego frente a la hemimédula espinal ipsilateral del vehículo sin tratamiento. En el caso de la PDH, una vez cuantificado los niveles relativos de pSer293 E1a y E1a total, se calculó la relación pSer293 / E1a total.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA

Los animales se sacrificaron mediante anestesia profunda (pentobarbital, 50 mg/kg intraperitoneal) y de inmediato las muestras de médula espinal se disecaron en hielo aislando la región lumbar L4-L6 ipsilaterales a la inyección o lesión, o de animales naïve. Los tejidos se cortaron en pequeños trozos y se colocaron en tubos de 2 ml con 1ml de Trizol (Thermo Fisher Scientific) reservándose a -80°C.

La extracción de ARN total de las muestras se llevó a cabo incorporando 1000µl de Trizol (Thermo Fisher Scientific) cada 10 mg de tejido, homogeneizándose mediante pipeteo repetido. A continuación, se añadió 200µl de cloroformo, dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos antes de centrifugarse 15 minutos a 4°C y 12.000 RCF. A la fase acuosa obtenida se le agrego el mismo volumen de alcohol isopropílico y 1 µl de glucógeno (19-22mg /ml, Thermo Fisher Scientific), manteniéndolo durante 20 minutos a -20 ° C. Luego, se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones que el anterior, el pellet obtenido se lavó con 200 µl de EtOH al 80% y se centrifugó nuevamente, esta vez a 5 minutos a 4°C y 12.000 RCF. Finalmente, el sedimento de ARN se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente y fue resuspendido en 50µl de agua libre de nucleasas RNasa (Thermo Fisher Scientific) y 1µl de Inhibidor de ARNasa (Thermo Fisher Scientific). Las posibles contaminaciones de ADN se eliminaron utilizando ADNasa (DNase-free,

Thermo Fisher Scientific). La calidad del ARN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, y su concentración se cuantificó empleando el Kit de ensayo Qubit®RNA BR (Thermo Fisher Scientific #Q33223).

Una vez extraído, el ARN se retrotranscribió empleando la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen #28025-013). Para el ARN extraído de los tejidos de los animales del modelo de dolor neuropático se emplearon cebadores aleatorios, en el caso del modelo de dolor inflamatorio se utilizaron cebadores oligo (dT) 12-18 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante: En un tubo, se combinó 1 µl de los cebadores correspondientes (0,1 µM), 100 ng de ARN total, 1 µl de dNTPs (10 µM) y agua libre de RNase hasta un volumen final de 12 µl. Se incubó 5 minutos a 56°C y luego en hielo. Seguidamente, se agregó 4 µl de buffer 5x, 2 µl de DTT (0,1M), 1 µl de inhibidor de RNAsas RNaseOUT (40 U/µL, Thermo Fisher Scientific) y 1µl de transcriptasa reversa M-MLV (200 U, Thermo Fisher Scientific). Luego se incubó a 37°C por 50 minutos, y finalmente a 70°C durante 15 minutos, con la finalidad de inactivar la transcriptasa reversa.

Las reacciones de Q PCR se realizaron empleando un sistema Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Todas las reacciones se realizaron por triplicado con 40 ng de ADNc cada uno. En las muestras de los animales del modelo de dolor neuropático, se utilizaron los siguientes reactivos TaqMan de Invitrogen/Applied Biosystems: TaqMan Fast Advanced Master Mix (#1205919), sondas que abarcan exones para IL-1β (#Mm01336189_m1) y TNF-α (#Mm00443258_m1). Control endógeno eucariótico y ARN 18S (#FAM-MGB 4333760). Los controles endógenos fue el ARN 18S eucariótico (FAM-MGB 4333760), y las condiciones de ciclo fueron 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguidos de 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Para el caso de las muestras de los animales del modelo de dolor inflamatorio, el ADNc obtenido se diluyó en Master Mix Biotools Quantimix Easy (Biotools) en un volumen de 10 µl. Las secuencias de cebadores específicos directos (F) y reverso (R) (IDT, Integrated DNA Technologies) fueron las siguientes: para GAPDH F: 5'-CAC TGA GCA TCT CCC TCA CAA-3' y R: 5'-TGG TAT TCG AGA GAA GGG AGG-3' como control endógeno, para IL-1β F: 5'-TGC TGA TGT ACC AGT TGG GG-3' y R: 5'- CTCCATGAGCTT TGT ACAAG-3' para TNF-α F: 5'-TGA TCGGTC CCA ACA AGG-3' y R: 5'-TGC TTG GTG GTT TGC TAC GA-3'. En este caso, las condiciones de ciclo fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 56°C (IL-1β y TNF-α) o 58°C (GAPDH) durante 30 segundos, 95°C durante 30 segundos y 70°C durante 30 segundos.

Todos los datos se analizaron utilizando el software Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science Sydney). La cuantificación se realizó con el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando muestras de médula

espinal sin tratamiento como controles negativos y los respectivos controles endógenos como referencia.

PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism 9, y los datos se presentaron como media $\pm$ SEM. Los tests usados fueron, t-tests, one-tailed o two-tailed ANOVA, seguido de múltiples comparaciones con el test de Bonferroni en el caso de comparación de datos entre dos grupos; o test de Tukey para comparar datos de experimentos con más de 2 grupos. El análisis estadístico de los experimentos en los cuales se registró el mismo animal a distintos puntos temporales, como los datos de comportamiento, volumen de la extremidad posterior y peso corporal, se obtuvo mediante el test two-tailed ANOVA para medidas repetidas seguido de un análisis de Bonferroni o Tukey dependiendo del número de grupos comparados. Se estableció la significancia estadística como $p < 0,05$. Para cada experimento y resultado, los valores n, p, F y/o t se indican en las leyendas de las figuras.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN LA MÉDULA ESPINAL DE MODELOS DE DOLOR CRÓNICO Y SU MODULACIÓN METABÓLICA POR DICLOROACETATO

1) *ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS DE DOLOR CRÓNICO*

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo de doctorado se utilizaron dos modelos de dolor crónico para el estudio de la relación de la actividad respiratoria mitocondrial y el desarrollo de las típicas características comportamentales en los animales con estas injurias [40], [43].

Para verificar que los animales experimentaban dolor, se llevaron a cabo tests de algesimetría térmica y mecánica, como se describió anteriormente en el apartado de materiales y métodos. Los registros se realizaron en distintos puntos temporales previos y posteriores a la inyección con ACF.

El estudio de la latencia de retirada de la extremidad posterior al calor, determinada por la aplicación un algesiómetro estándar (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA), mostró una hiperalgesia térmica en la extremidad dañada comparada con la contralateral. A las 24h de la inyección, registramos una disminución del 40% de la latencia de la extremidad dañada respecto de la mostrada por la extremidad contralateral, similar a lo reportado en la literatura para este modelo [40]. Si bien esta diferencia se fue acortando durante el curso temporal, la latencia de retirada de la extremidad posterior inyectada con ACF se mantuvo en valores significativamente inferiores a los de la extremidad posterior contralateral, no alcanzando el 80% del valor de esta última (Figura 13A) en el último día de seguimiento (13 dpi).

La presencia de alodinia se evaluó mediante el estímulo mecánico con los filamentos de von Frey [286] en los mismos días en que se realizaron los tests de algesimetría térmica. El

umbral de retirada de la extremidad posterior frente a las distintas fuerzas aplicadas, representado como el LD50%, reveló una alodinia mecánica, representada gráficamente como una disminución progresiva en los días posteriores a la inyección de ACF (Figura 13B). Dicho umbral fue significativamente menor en el miembro posterior inyectado con ACF respecto al contralateral, evidenciándose de forma temprana a las 24 h de la inyección, en un 40% de los valores de las extremidades contralaterales y llegando a un 20% al final del seguimiento (Figura 13B). Como ya ha sido previamente reportado [40], [43], [292], [293], la extremidad posterior contralateral sufrió una disminución en dicho umbral en comparación con su basal, acercándose, pero sin alcanzar, a los valores de la extremidad posterior ipsilateral (Figura 13B).

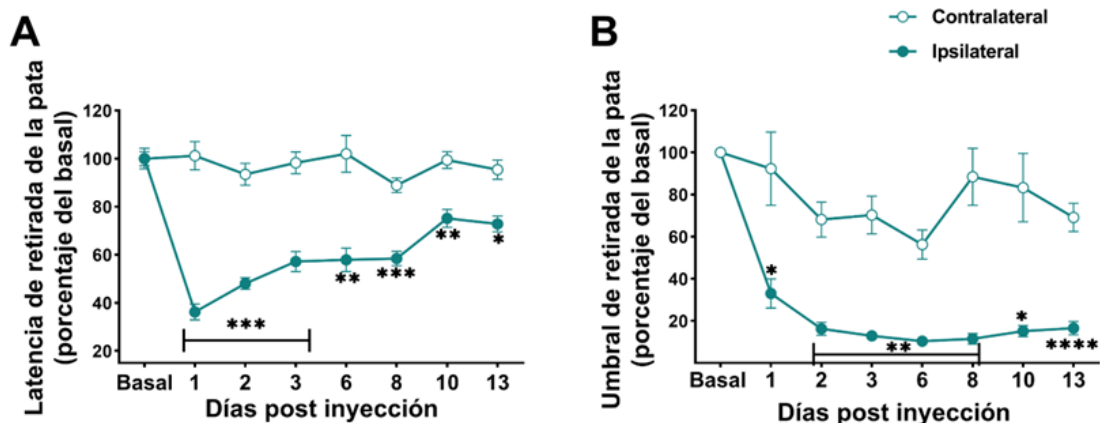


Figura 13. Comportamiento relacionado con el dolor en animales con inyección de adyuvante completo de Freud. Evolución de la hiperalgesia térmica (A) y alodinia mecánica (B) de las patas ipsilaterales y contralaterales a la inyección con ACF. ANOVA-RM de dos vías, para efectos del tratamiento: para hiperalgesia térmica: $P < 0,0001$, $F_{1,10} = 137,10$; para alodinia mecánica: $P = 0,0001$, $F_{1,13} = 55,52$. Resultados del test de comparación múltiple de Bonferroni: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ significativamente diferentes de las patas contralaterales. ANOVA-RM, análisis de varianza de medidas repetidas. $n = 6$ animales.

Para completar la caracterización del modelo de inyección de ACF como modelo de dolor inflamatorio evaluamos el edema y eritema (enrojecimiento) local que manifestaron los animales en la extremidad posterior inyectada con el ACF (Figura 14A-B). Se midió el volumen de las extremidades posteriores a lo largo del tiempo que duró el ensayo. La inflamación de las extremidades inyectadas fue evidente a las 24 h de la inyección del ACF. Los volúmenes de las extremidades inflamadas fueron significativamente mayores que los de las contralaterales a la inyección y no inflamadas (Figura 14A). El registro mostró un

aumento de aproximadamente del 200% en relación al volumen de la extremidad posterior contralateral a la inyección, manteniéndose en ese valor hasta los 13 dpi (Figura 14A).

Por otra parte también registramos el peso corporal de los animales. El peso corporal de los animales inyectados con ACF se redujo significativamente comparado con el de los animales no inyectados durante el transcurso de los 13 dpi (Figura 14C). Todas estas observaciones fueron concordantes con los estudios realizados por Stein et al., quienes propusieron el modelo por primera vez en 1899 [38].

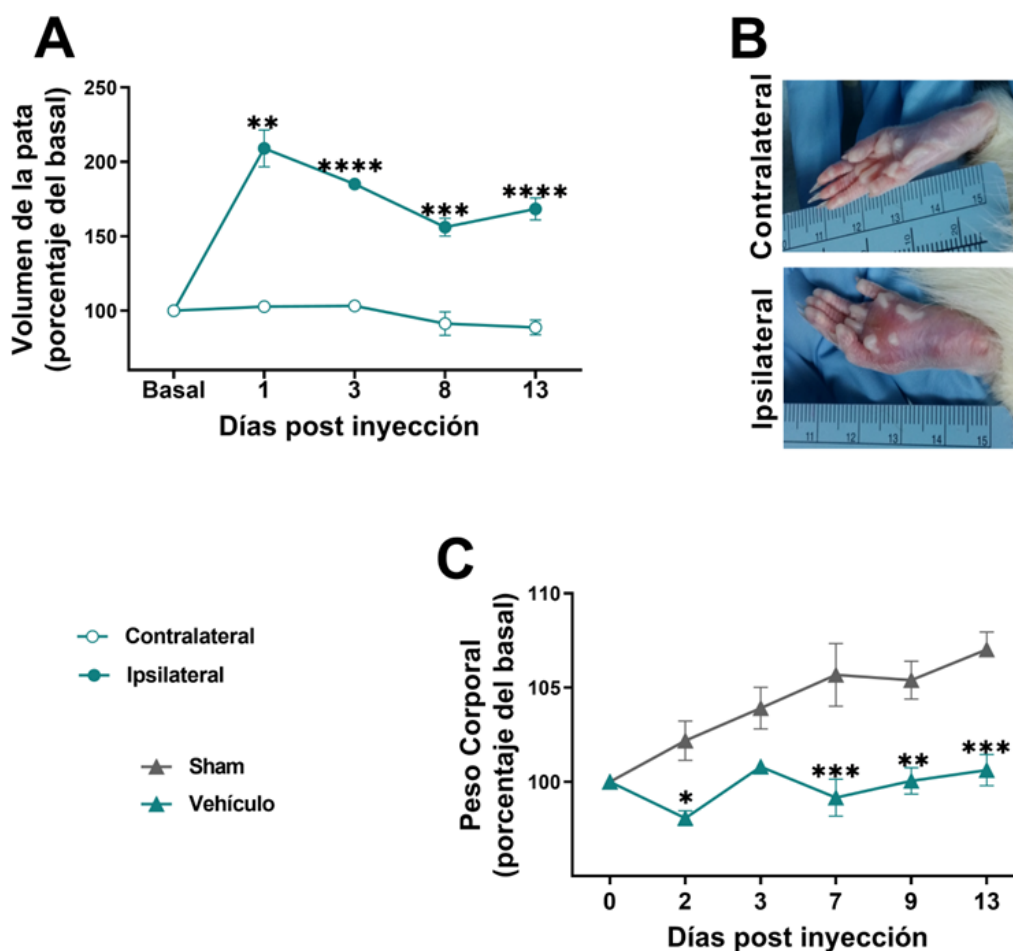


Figura 14. Curso temporal de los cambios de volumen de las patas posteriores y el peso corporal en animales con inyección de adyuvante completo de Freud. A) Gráfico de la evolución temporal del volumen de las patas posteriores, calculado como se explica en la sesión de materiales y métodos. **B)** Imagen representativa de la apariencia de la extremidad posterior contralateral y del edema de la extremidad posterior ipsilateral a la inyección con ACF a los 13 dpi. **C)** Gráfico del seguimiento del peso corporal de los animales a lo largo del estudio. ANOVA-RM de dos vías, para efectos del tratamiento: Volumen de la pata: $P < 0,0001$, $F_{1,10} = 291,80$; peso corporal: $P = 0,0081$, $F_{1,4} = 23,86$. Resultados del test de comparación múltiple de Bonferroni: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ significativamente diferentes de las patas contralaterales o a animales sham. dpi, días post inyección; ANOVA-RM, análisis de varianza de medidas repetidas. $n = 6$ animales por grupo.

El modelo de dolor neuropático mediante la constricción crónica del nervio ciático se realizó en ratones machos adultos C57BL/6, y se evaluó el desarrollo de hiperalgesia térmica. De manera similar a los animales con dolor inflamatorio, se empleó un algesiómetro estándar para la determinación de la latencia de retirada de la extremidad posterior al calor. De manera análoga a datos ya reportados en modelos animales de dolor neuropático [43], [292], [293], los animales manifestaron una disminución significativa en la latencia de retirada de la extremidad posterior lesionada en relación a la extremidad posterior contralateral. Los registros realizados a las 24h después de la lesión, revelaron el inmediato desarrollo de hiperalgesia térmica en las extremidades ipsilaterales a la injuria en comparación con las contralaterales. Se constató una latencia de retirada en la extremidad ipsilateral al daño del 40% de la registrada en las extremidades contralaterales (Figura 15). Esta disminución en la latencia de retirada de la extremidad posterior se observó en todos los tiempos analizados, recuperando hasta el 60% de los valores de la extremidad posterior contralateral a los 19 dpl (Figura 15).

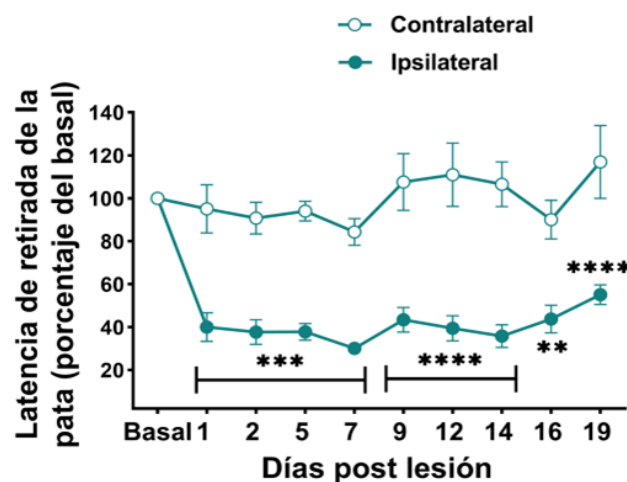


Figura 15. Comportamiento relacionado con el dolor en animales con constricción crónica del nervio ciático. Evolución de la hiperalgesia térmica de las extremidades ipsi y contralaterales a la lesión. ANOVA-RM de dos vías, para efectos del tratamiento: $P = 0,0004$, $F_{1,6} = 50,73$. Resultados del test de comparación múltiple de Bonferroni: $**P < 0,01$; $***P < 0,001$ y $****P < 0,0001$ significativamente diferentes de las patas contralaterales. ANOVA-RM, análisis de varianza de medidas repetidas. $n = 5$ animales.

2) CURSO TEMPORAL DE LA REACTIVIDAD GLIAL EN ANIMALES CON INYECCIÓN DE ADYUVANTE COMPLETO DE FREUD Y CONSTRICCIÓN CRÓNICA DEL NERVIO CIÁTICO

Otra característica de los modelos de dolor crónico, además de los comportamientos de hiperalgesia y alodinia, es la respuesta de las células gliales, en particular de los astrocitos y la microglía, en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la injuria. Estas poblaciones celulares experimentan cambios morfológicos evidentes y en la expresión de marcadores característicos utilizados, lo cual ha sido descrito en varios modelos de dolor crónico [40], [198], [294], [295]. Para determinar si la inyección intraplantar de ACF y la lesión por CCI generaron esta respuesta típica en astrocitos y microglía, se realizaron estudios de inmunofluorescencia para GFAP e Iba-1, respectivamente, en el asta dorsal ipsi y contralateral de la médula espinal lumbar a nivel L4-L6.

Las observaciones morfológicas de las imágenes de inmunofluorescencia adquiridas de la médula espinal de ambos modelos de dolor crónico, mostraron que, en el lado ipsilateral, el aspecto de los astrocitos se caracterizó por hipertrofia, así como un aumento en la abundancia y grosor de sus prolongaciones (Figura 16A y Figura 17A). De manera similar, en el caso de la microglía, se observó un notorio aumento en el tamaño celular y grosor de sus prolongaciones (Figura 16C y Figura 17C).

Como ya ha sido reportado en el modelo de dolor inflamatorio [40], al realizar la cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia para GFAP e Iba-1 en el asta dorsal, se constató un aumento significativo en los valores de inmunoreactividad de ambos marcadores en el lado ipsilateral en contraste con el lado contralateral (Figura 16B y D). En el caso del GFAP, el promedio obtenido en el lado ipsilateral a los 3 dpi fue de un 200% superior a la del lado contralateral. Esta observación se mantuvo a los 7 dpi, superando el 200% a los 13 dpi (Figura 16B). La inmunofluorescencia para Iba-1 también mostró un aumento de la inmunoreactividad en el lado ipsilateral, llegando a alcanzar, a los 13 dpi, un promedio del 130% comparado con la misma región del lado contralateral (Figura 16D).

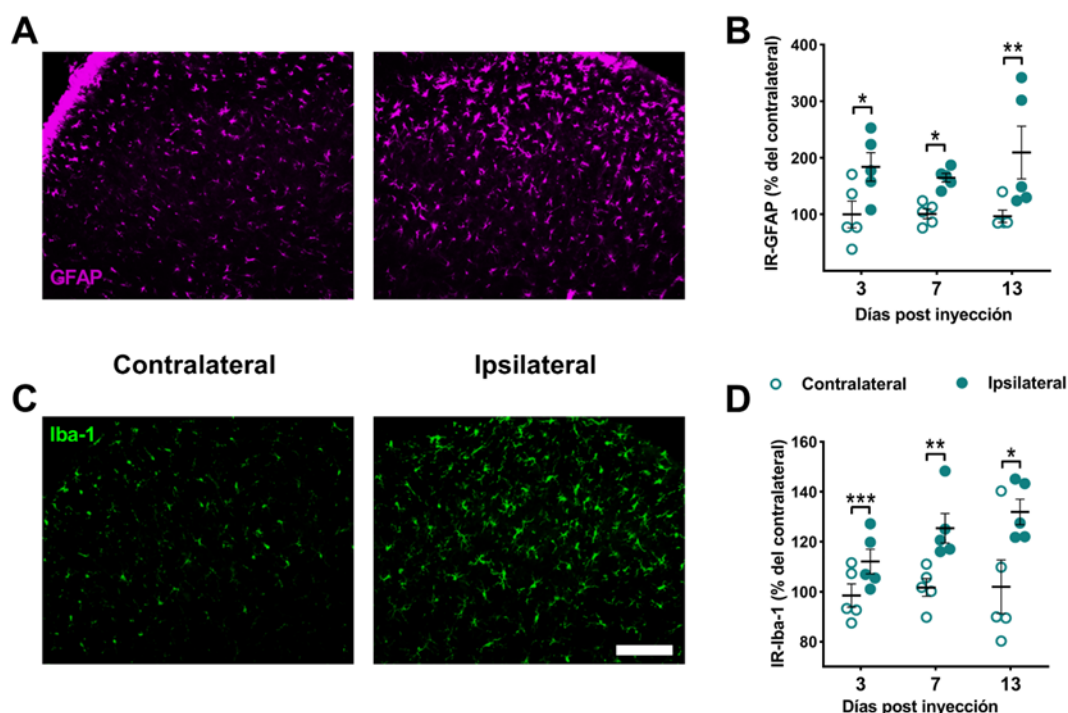


Figura 16. Curso temporal de la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud. A-B Inmunorreactividad (IR) de GFAP. **C-D** Inmunorreactividad de Iba-1. Imágenes representativas de epifluorescencia del asta dorsal de la médula espinal contra e ipsilateral a la inyección como se indica, inmunomarcación para GFAP (A) o Iba-1 (C) a los 13 dpi. Cuantificación de la Inmunorreactividad para GFAP (B) o Iba-1 (D) medida como el porcentaje del área total ocupada por la inmunorreactividad en el lado ipsi y contralateral a la inyección en los días indicados después de la inyección. t-Student: GFAP: 3 dpi: $P = 0,0320$, $t_4 = 3,229$; 7 dpi: $P = 0,0472$, $t_4 = 2,833$; 13 dpi: $P = 0,0015$, $t_4 = 7,695$. Iba-1: 3 dpi: $P = 0,0009$, $t_4 = 7,275$; 7 dpi: $P = 0,0017$, $t_4 = 6,238$; 13 dpi: $P = 0,0389$, $t_4 = 2,359$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ significativamente diferentes del lado contralateral correspondiente. IR, Inmunorreactividad. dpi, días post inyección. $n = 5$ animales (10 cortes de médula espinal por animal). Barra de escala 200 μ m.

En cuanto al modelo de dolor neuropático, de manera similar a lo observado para el modelo de dolor inflamatorio, los resultados obtenidos de los estudios de inmunofluorescencia revelaron un aumento significativo de la inmunorreactividad, para los dos marcadores gliales analizados, en el asta dorsal ipsilateral en contraste al contralateral (Figura 17B y D), concordando con reportes anteriores [209]. En este caso, el registro temporal de la inmunorreactividad para GFAP mostró un aumento progresivo en el asta dorsal ipsilateral en comparación al contralateral, expresándose en valores de alrededor del 200% a los 3 y 7 dpi, y superando dicho porcentaje a los 13 dpi (Figura 17B). Por el contrario, en la inmunorreactividad para Iba-1 el aumento más significativo en el lado ipsilateral se constató en el inicio del estudio, a los 3 dpi, alcanzando un promedio del 500% en comparación con el lado contralateral. Luego se registró una disminución temporal, alcanzando un promedio

de 300% a los 19 dpl (Figura 17D), demostrando una clara diferencia entre los cursos temporales de la reactividad glial de astrocitos y de microglía [209].

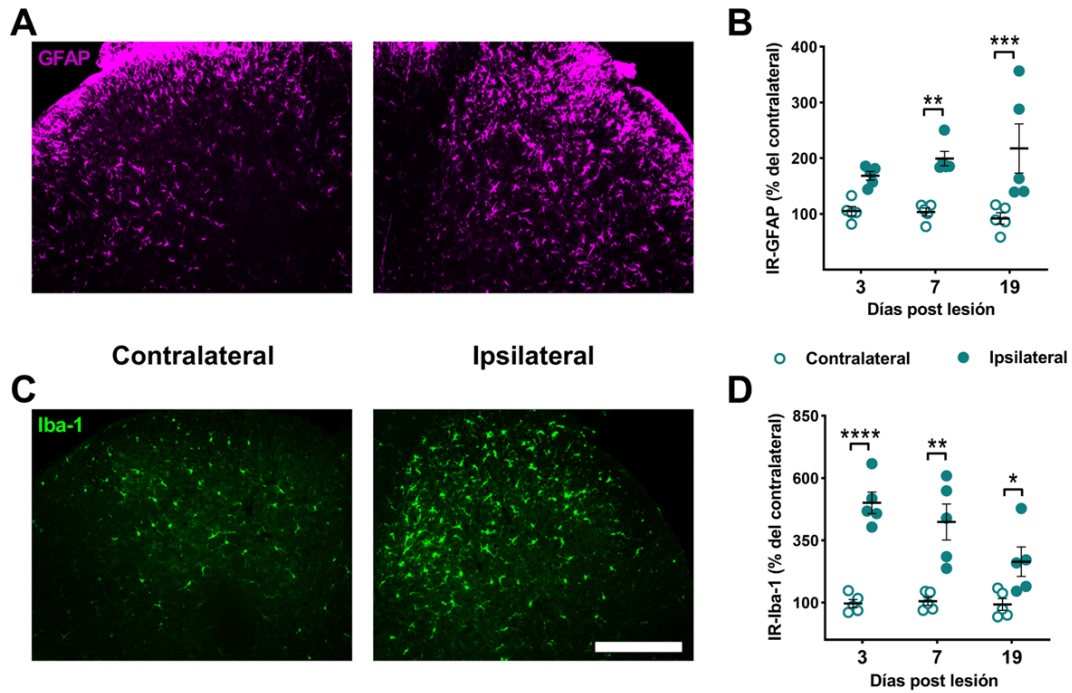


Figura 17. Curso temporal de la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal de animales con constricción crónica del nervio ciático. A-B) Inmunorreactividad (IR) de GFAP. **C-D)** inmunorreactividad de Iba-1. Imágenes representativas de epifluorescencia del asta dorsal de la médula espinal contra e ipsilateral a la lesión como se indica, inmunomarcación para GFAP (A) o Iba-1 (C) a los 19 dpl. Cuantificación de la inmunorreactividad para GFAP (B) o Iba-1 (D) medida como el porcentaje del área total ocupada por la marca en el lado ipsi y contralateral a la lesión en los días indicados después de la lesión. t-Student: GFAP: 3 dpl: $P = 0,0761$, $t_4 = 2,379$; 7 dpl: $P = 0,0021$, $t_4 = 7,067$; 19 dpl: $P = 0,0002$, $t_4 = 13,26$. Iba-1: 3 dpl: $P < 0,0001$, $t_4 = 13,87$; 7 dpl: $P = 0,0024$, $t_4 = 5,642$; 19 dpl: $P = 0,0120$, $t_4 = 3,537$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ significativamente diferentes del lado contralateral correspondiente. IR, Inmunorreactividad; dpl, días post lesión. $n = 5$ animales (10 cortes de médula espinal por animal). Barra de escala 200 μ m.

3) ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN LA MÉDULA ESPINAL LUMBAR DE ANIMALES CON LESIONES QUE PROVOCAN DOLOR CRÓNICO

Como se expuso anteriormente, la reactividad glial en la médula espinal ha sido asociada a modificaciones metabólicas en modelos animales de patologías del SNC como la ELA [269], [271]. Para indagar si la función mitocondrial se encontraba alterada en la médula espinal lumbar de animales con dolor crónico, se realizaron estudios de respirometría de alta resolución en la médula espinal de animales inyectados con ACF o con constricción crónica el nervio ciático (Figura 9). Esto permitió obtener los valores del consumo de oxígeno de las biopsias de médula espinal tras la adición de distintos sustratos, inhibidores y agentes desacoplantes, tal como se especifica en la sección materiales y métodos. El aislamiento de las muestras se realizó en el punto temporal donde se observó la mayor astrogliosis en ambos modelos, 13 dpi en los animales con inyección de ACF (Figura 16B) y 19 dpi en animales con constricción crónica del ciático (Figura 17B).

En las muestras de médulas de las ratas con inyección de ACF, se detectó una notoria reducción en las curvas de consumo de oxígeno en las hemimédulas ipsilaterales a la injuria en contraposición a las obtenidas en las contralaterales (Figura 18A).

Con las pendientes generadas de las curvas de flujo de oxígeno, se obtuvieron distintos parámetros respiratorios que permitieron analizar de un modo más detallado las diferencias observadas en los registros. De los parámetros obtenidos, encontramos diferencias significativas en la respiración en estado 3, en la respiración dependiente de ATP y en la respiración máxima entre las hemimédulas ipsi y las contralaterales al lado de inyección (Figura 18B). En cambio, no se detectaron diferencias entre ambas regiones medulares en la respiración en estado 4, ni en la respiración independiente de ATP continúa luego del agregado de oligomicina (ATP independiente) (Figura 18B).

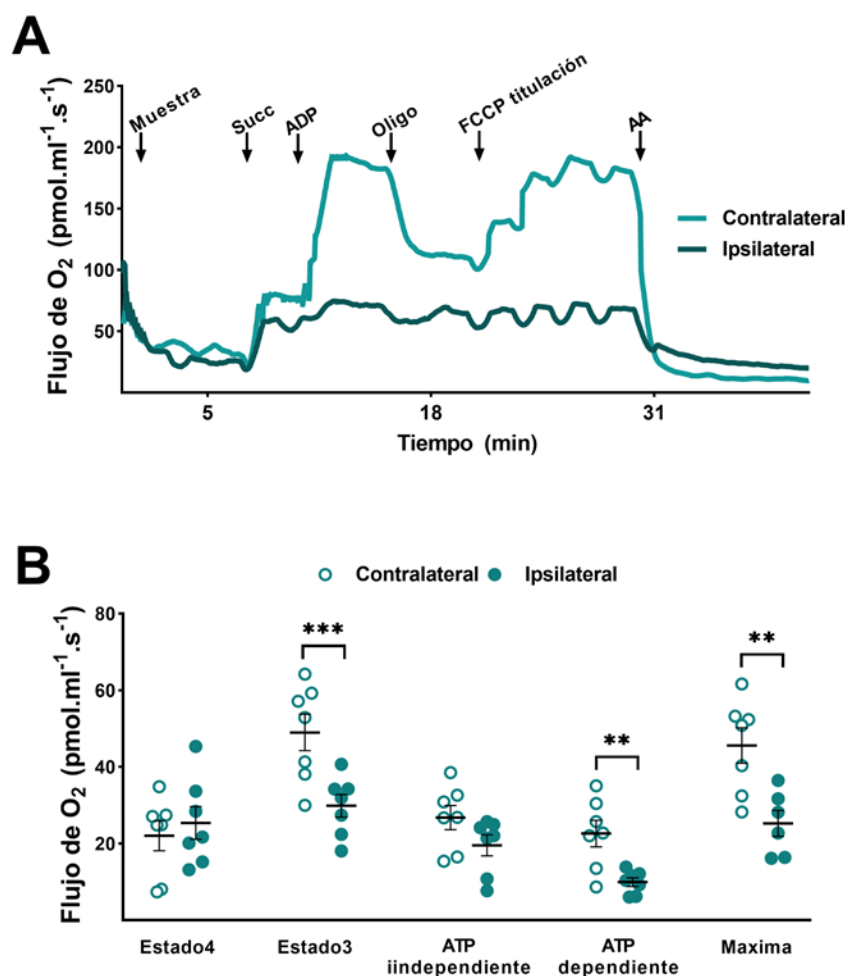


Figura 18. Respirometría de alta resolución en hemimédulas de animales con inyección de adyuvante completo de Freud. A) Registros superpuestos representativos de las curvas de flujo de O_2 en muestras permeabilizadas frescas de médula espinal L4-6, ipsi y contralateral a los 13 dpi. Con flechas negras se indica el momento de adición de Succinato (Succ), Adenosín difosfato (ADP) Oligomicina (Oligo) Carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) Antimicina A (AA). **B)** Se muestran los parámetros bioenergéticos mitocondriales obtenidos a partir de los registros mostrados. Cada punto corresponde al registro de una hemimédula y se compara con la contralateral como se indica. t-Student: estado 4: $P = 0,2100$, $t_6 = 0,8654$; estado 3: $P = 0,0004$, $t_6 = 6,191$; ATP independiente: $P = 0,0553$, $t_{12} = 1,723$; ATP dependientes: $P = 0,0027$, $t_6 = 4,235$; Máximo: $P = 0,0059$, $t_5 = 3,874$. $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$ significativamente diferentes del contralateral correspondiente. dpi, días post inyección. $n = 5$ a 7 .

En lo referente a los animales con constricción crónica de nervio ciático, debido a la menor cantidad de tejido obtenido, el ensayo se realizó comparando biopsias de animales sujetos a CCI bilateral y animales naïve.

De manera consistente con lo observado en el modelado por inyección de ACF, las médulas lumbares de los animales con CCI bilateral mostraron una disminución significativa de las curvas de consumo de oxígeno en comparación con las de animales naïve (Figura 19A). Por su parte, los valores del consumo de oxígeno en el estado 4 y ATP independiente de las

biopsias de animales lesionados y naïve fueron similares (Figura 19B). Sin embargo, el estado 3, el ATP dependiente y la máxima respiración, mostraron valores significativamente menores en los animales con CCI bilateral comparados con los alcanzados por las biopsias de los animales naïve (Figura 19B).

Estos resultados revelan que las lesiones que inducen dolor crónico se asocian con una disminución significativa en los niveles de consumo de oxígeno en la región de la médula espinal relacionada con el sitio donde se procesa la información de la lesión.

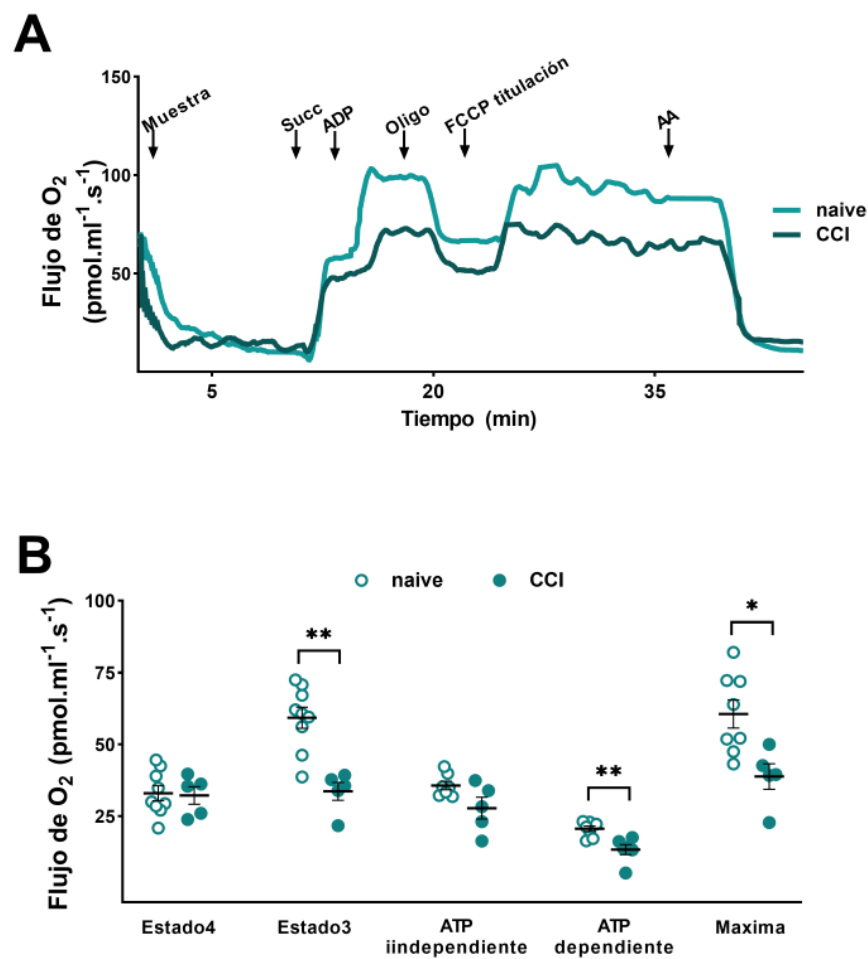


Figura 19. Respirometría de alta resolución en médulas de animales con constricción crónica del nervio ciático. **A)** Registros superpuestos representativos de las curvas de flujo de O₂ en muestras permeabilizadas frescas de médula espinal L4-6 de animales con lesión bilateral a los 19 dpl y animales naïve. Con flechas negras se indica el momento de adición de Succinato (Succ), Adenosín difosfato (ADP) Oligomicina (Oligo) Carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) Antimicina A (AA). **B)** Se muestran los parámetros bioenergéticos mitocondriales obtenidos a partir de los registros mostrados. Cada punto corresponde al registro de una médula y se compara con la contralateral como se indica. t-Student: estado 4: $P = 0,3657$, $t_4 = 0,3681$; estado 3: $P = 0,004$, $t_4 = 4,874$; ATP independiente: $P = 0,1851$, $t_3 = 1,052$; ATP dependientes: $P = 0,0074$, $t_5 = 3,645$; Máximo: $P = 0,0162$, $t_4 = 3,217$. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ significativamente diferentes del naïve correspondiente. CCI, constricción crónica del nervio ciático; dpl, días post lesión. $n = 5$ a 9 .

4) **EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON DICLOROACETATO EN LA ACTIVIDAD DE LA PDH A NIVEL DE LA MÉDULA ESPINAL**

Con el fin de analizar el papel que cumple la respiración mitocondrial en el establecimiento del dolor crónico, decidimos estimular la misma con DCA y evaluar si podíamos mejorar el consumo de oxígeno. Los animales lesionados se dividieron en dos grupos: uno que recibió DCA en el agua de beber y otro que sólo recibió agua tal como se indica en métodos. En primer lugar, verificamos que el DCA administrado de forma sistémica es capaz de actuar a nivel de la médula espinal, evaluando los niveles de expresión de las fracciones total y fosforilada de la enzima PDH mediante técnicas de WB. Las proteínas extraídas de la hemimédula lumbar ipsilateral a la inyección en los animales con dolor inflamatorio a los 13 dpi y de animales naïve, tratados con DCA o con vehículo, se sometieron a inmunotransferencias. Las imágenes obtenidas delataron a simple vista bandas correspondientes a la pPDH de menor intensidad en las muestras de animales sujetos al tratamiento sistémico con DCA. Mientras que las bandas correspondientes a la PDH total mostraron un aspecto similar en todas las muestras provenientes de los diferentes grupos de experimentación (Figura 20A). La cuantificación, reveló que los niveles de expresión de la pPDH fueron significativamente menores en las muestras de animales tratados con DCA que en las muestras de animales tratados con vehículo, tanto con dolor inflamatorio como naïve (Figura 20B).

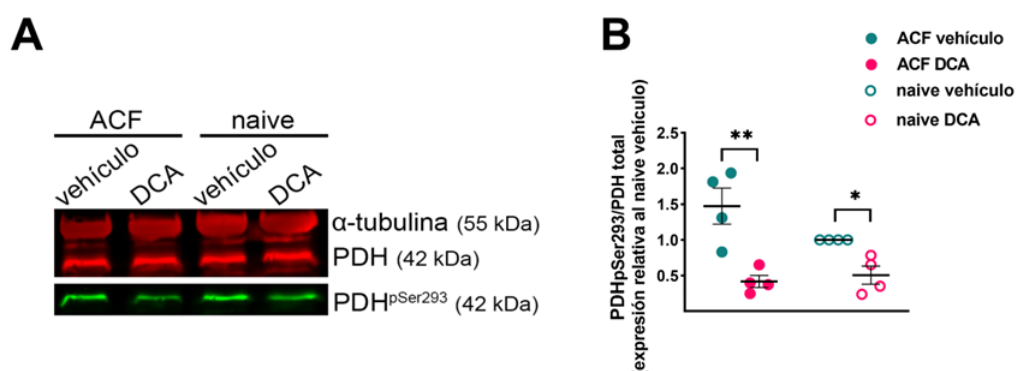


Figura 20. Disminución de los niveles de pPDH en muestras de la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud tratados con dicloroacetato. A) Imagen representativa de la inmunotransferencia de muestras de médula espinal L4-6 ipsilateral a la inyección y naïve, para PDH-E1a (pSer293), PDH-E1a total y α -tubulina. Los animales fueron tratados con DCA o vehículo como se indica en la sesión de materiales y métodos. **B)** Cuantificación de la relación entre los niveles relativos densitométricos de PDH-E1a (pSer293) y PDH-E1a total, normalizados frente al vehículo sin tratamiento. La α -tubulina se utilizó como referencia. Las muestras fueron obtenidas a los 13 dpi. Resultados de ANOVA unidireccional: $P = 0.0010$, $F_{3,12} = 10.89$. Resultados del test de comparación múltiple de Bonferroni: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ significativamente diferentes del naïve correspondiente. ACF, Adyuvante Completo de Freund; DCA, dicloroacetato; dpi, días post inyección; ANOVA, análisis de varianza. $n = 4$ animales por grupo.

Al igual que en los animales con dolor inflamatorio, las muestras de hemimédula lumbar ipsilateral de animales con dolor neuropático a los 19 dpl y de animales naïve tratados con DCA mostraron bandas más tenues correspondientes a la pPDH, en comparación con las bandas de los grupos tratados con vehículo (Figura 21A). Además, se observó que las bandas de PDH total tenían un aspecto similar en todas las muestras de los diferentes grupos experimentales (Figura 21A).

La cuantificación de la relación entre los niveles de expresión de la pPDH y la PDH total, arrojaron resultados concordantes con las observaciones de las imágenes de inmunotransferencias. Los niveles de expresión de la pPDH fueron significativamente menores en las muestras de los animales tratados con DCA, en comparación con los animales tratados con vehículo (Figura 21B).

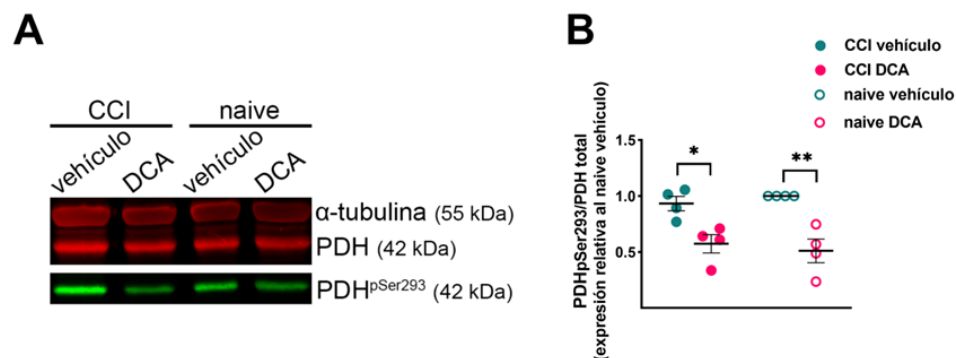


Figura 21. Disminución de los niveles de pPDH en la médula espinal de animales con constricción crónica del nervio ciático tratados con dicloroacetato. A) Imagen representativa de la inmunotransferencias de muestras de médula espinal L4-6 ipsilateral a la lesión y naïve, para PDH-E1a (pSer293), PDH-E1a total y α -tubulina. Los animales fueron tratados con DCA o vehículo como se indica en la sesión de materiales y métodos. **B)** Cuantificación de la relación entre los niveles relativos densitométricos de PDH-E1a (pSer293) y PDH-E1a total, normalizados frente al vehículo sin tratamiento. La α -tubulina se utilizó como referencia. Las muestras fueron obtenidas a los 19 dpl. Resultados de ANOVA unidireccional: $P = 0.0001$, $F_{4,13} = 21,40$. Resultados del test de comparación múltiple de Bonferroni: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ significativamente diferentes del naïve correspondiente. CCI, constricción crónica del nervio ciático; DCA, dicloroacetato; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 4$ animales por grupo.

De esta manera, podemos concluir que la administración oral de DCA inhibió la actividad de la PDK a nivel de la médula espinal en ambos modelos de dolor crónico.

5) EFECTO DE LA MODULACIÓN METABÓLICA CON DICLOROACETATO SOBRE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON LESIONES QUE INDUCEN DOLOR CRÓNICO

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de DCA a los animales, se realizaron ensayos de respirometría de alta resolución [288] en biopsias de médula espinal lumbar de animales con lesiones que inducen dolor crónico y animales naïve, tratados con DCA o vehículo.

Los estudios de respirometría de alta resolución en hemimédulas ipsilaterales de animales con inyección de ACF, tratados con dicloroacetato (DCA), mostraron un aumento significativo en los tres parámetros respiratorios que estaban disminuidos en los animales lesionados tratados con vehículo (Figura 22).

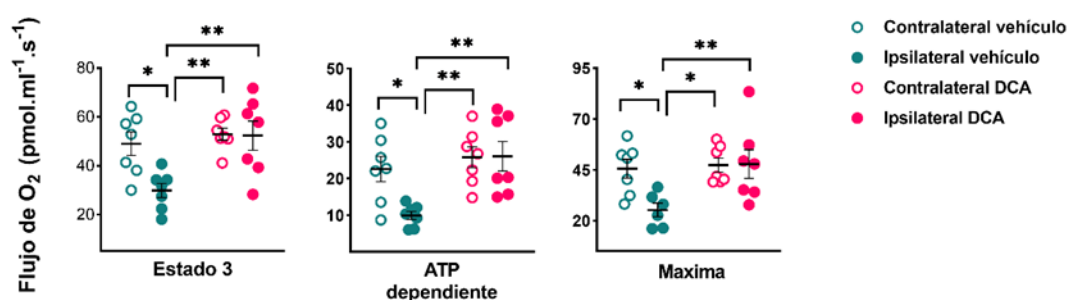


Figura 22. El tratamiento con dicloroacetato aumentó los parámetros bioenergéticos mitocondriales que se habían reducido en la hemimédula espinal ipsilateral a la inyección de adyuvante completo de Freud. Parámetros bioenergéticos de muestras de médula espinal L4-6 ipsi y contralateral a la inyección, tratadas con vehículo o con DCA, a los 13 dpi. Resultados de ANOVA unidireccional: estado 3: $P = 0,0022$, $F_{3,24} = 6,536$; ATP dependiente: $P = 0,0029$, $F_{3,24} = 6,187$; Máximo: $P = 0,0138$, $F_{3,23} = 4,400$. Resultados de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; dpi, días post inyección; ANOVA, análisis de varianza. $n = 7$ animales por grupo.

Tal como se observó para los animales con dolor inflamatorio, en los animales con CCI, el tratamiento con DCA indujo un aumento significativo en los parámetros respiratorios de las médulas espinales lumbares en comparación con las médulas de animales lesionados que no recibieron tratamiento o en los animales naïve (Figura 23).

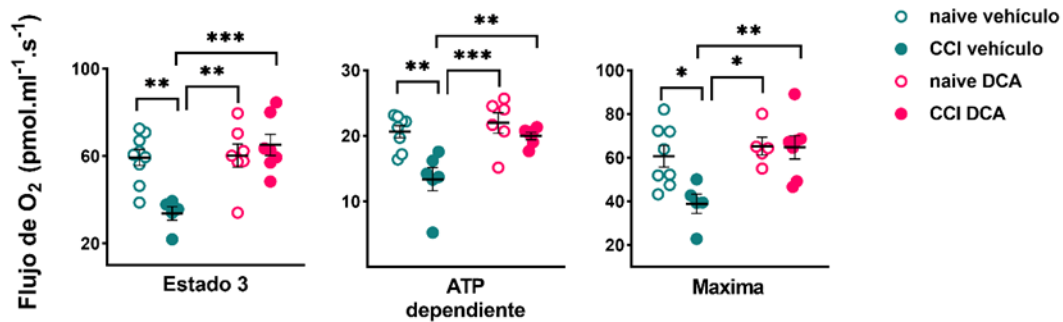


Figura 23. El tratamiento con dicloroacetato aumentó los parámetros bioenergéticos mitocondriales que se habían reducido en la médula espinal de los animales con contricción crónica del nervio ciático bilateral. Parámetros bioenergéticos de muestras de médula espinal L4-6 de animales con lesión bilateral y animales naïve, tratadas con vehículo o con DCA, a los 19 dpl. Resultados de ANOVA unidireccional: estado 3: $P = 0,0008$, $F_{3,24} = 7,848$; ATP dependiente: $P = 0,0005$, $F_{3,22} = 8,861$; Máximo: $P = 0,0074$, $F_{3,21} = 5,246$. Resultados de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $***P < 0,001$ significativamente diferentes entre los indicados. CCI, contricción crónica del nervio ciático; DCA, dicloroacetato; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 5$ a 9 animales por grupo.

En ninguno de los casos estudiados se advirtieron alteraciones en los valores de los parámetros respiratorios obtenidos en biopsias de hemimédula contralateral o de animales naïve tras la administración de DCA (Figura 22 y Figura 23). Sin embargo, dichos resultados arrojaron evidencias convincentes de la capacidad de la modulación metabólica por DCA para restaurar los niveles de consumo de oxígeno mitocondrial en la médula espinal lumbar de animales con dolor crónico.

6) EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN MITOCONDRIAL CON DICLOROACETATO SOBRE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA DE ANIMALES CON LESIONES QUE INDUCEN DOLOR CRÓNICO

A fin de explorar si los fenómenos metabólicos encontrados en la médula espinal lumbar se asociaban con los patrones de conducta de los animales con dolor crónico, se efectuaron tests de algimetría para evaluar la hiperalgesia térmica y/o alodinia mecánica, como se describió en la sesión materiales y métodos. De esta manera, se utilizaron dos grupos de animales inyectados con ACF y dos grupos lesionados con CCI; en ambos modelos de dolor crónico, un grupo fue tratado con DCA y otro con vehículo.

Los animales con dolor inflamatorio fueron monitoreados durante el transcurso del tratamiento (DCA o vehículo) con el equipo de algometría térmica y filamentos von Frey, desde el primer día luego de la inyección con ACF hasta los 13 dpi. Los registros obtenidos de animales tratados con DCA mostraron, con el transcurso de los días, un aumento progresivo de las latencias y los umbrales de retirada de la extremidad posterior ipsilateral (Figura 24A-B). En el caso de la latencia de retirada de la extremidad posterior ipsilateral ante el estímulo calórico, el aumento fue significativo, en comparación con la extremidad posterior ipsilateral de los animales tratados con vehículo, a partir del 8 dpi y sostenido hasta el 13 dpi. Por el contrario, la diferencia con la extremidad posterior contralateral dejó de ser significativa a partir del 6 dpi, igualándose a los 10 dpi (Figura 24A). Por otro lado, los valores de umbral de retirada ante estímulos mecánicos de la extremidad posterior ipsilateral de los animales a los cuales se le administró DCA, fueron significativamente mayores a los de la extremidad posterior ipsilateral de animales tratados con vehículo, a partir del 8 dpi y no significativos en comparación a la extremidad posterior contralateral a partir del 10 dpi (Figura 24B).

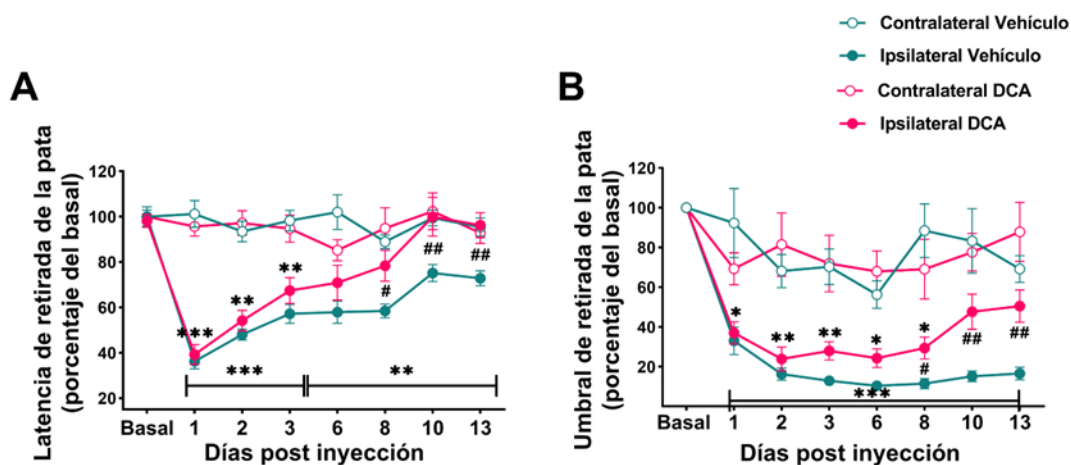


Figura 24. El dicloroacetato redujo la latencia y el umbral de retirada de la extremidad dañada en animales con inyección de adyuvante completo de Freud. A) Evolución de la hiperalgesia térmica para las extremidades ipsi y contralaterales a la inyección de animales tratadas con DCA o vehículo. **B)** Evolución de la alodinia mecánica para las extremidades ipsi y contralaterales a la inyección de animales tratados con DCA o vehículo. ANOVA-RM de dos vías, para efectos del tratamiento: Hiperalgesia térmica: $P < 0,0001$, $F_{3,20} = 53,36$; alodinia mecánica: $P < 0,0001$, $F_{3,25} = 20,39$. Resultados de comparación múltiple de Tukey: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ significativamente diferentes de las extremidades contralaterales (vehículo y DCA). # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ significativamente diferentes de la extremidad posterior ipsilateral del vehículo. DCA, dicloroacetato; ANOVA-RM, análisis de varianza de medidas repetidas. $n = 6$ animales por grupo.

En lo que refiere a los animales con dolor neuropático, llamativamente, el tratamiento con DCA determinó un aumento significativo en la latencia de retirada de la extremidad posterior ipsilateral, en comparación a su homóloga en los animales sujetos a la administración de vehículo. Esta diferencia se comenzó a evidenciar en los registros a partir del día 5 dpl, prolongandose hasta el final del período evaluado (19 dpl) (Figura 25). A partir del día 12 dpl, las latencias de retirada de la extremidad posterior ipsilateral de los animales tratados con DCA no mostraron diferencias significativas en comparación con las latencias de las extremidades contralaterales, tanto en los animales tratados con DCA como en aquellos tratados con vehículo (Figura 25).

Cabe destacar, que el DCA no provocó ningún efecto significativo sobre la respuesta sensorial de la extremidad posterior contralateral en comparación con la extremidad posterior contralateral de animales tratados con vehículo, en ninguno de los dos modelos utilizados (Figura 24 y Figura 25).

Estos resultados mostraron que el tratamiento oral con DCA redujo la hiperalgesia y la alodinia características de los modelos animales de dolor crónico.

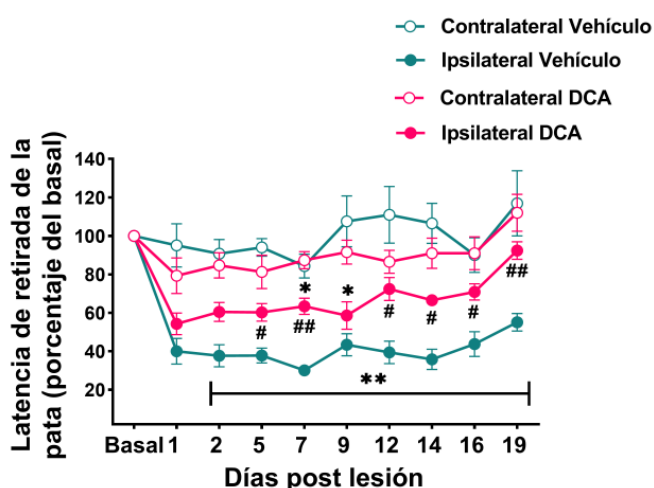


Figura 25. El dicloroacetato redujo la latencia de retirada de la extremidad lesionada en animales con contricción crónica del nervio ciático. Evolución de la hiperalgesia térmica para patas ipsi y contralaterales a la lesión de animales tratadas con DCA o vehículo. ANOVA-RM de dos vías, para efectos del tratamiento: $P < 0,0001$, $F_{3,14} = 28,08$. Resultados de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$ y $**P < 0,01$ significativamente diferentes de las patas contralaterales (vehículo y DCA). $\#P < 0,05$ y $\##P < 0,01$ significativamente diferentes de la extremidad posterior ipsilateral del vehículo. DCA, dicloroacetato; ANOVA-RM, análisis de varianza de medidas repetidas. $n = 4$ a 5 animales por grupo.

7) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE DICLOROACETATO SOBRE EL EDEMA LOCAL Y EL PESO CORPORAL DE ANIMALES CON LESIONES QUE INDUCEN DOLOR INFLAMATORIO

Como se mencionó al inicio de la sección de resultados, una de las herramientas utilizadas para caracterizar el modelo de dolor inflamatorio fue el monitoreo del edema local resultante de la inyección de ACF y del peso corporal de los animales inyectados (Figura 14). Cabe recordar que dichos monitoreos evidenciaron un aumento significativo en el volumen de la extremidad posterior inoculada con el agente inflamatorio ACF, al compararlo con la extremidad posterior contralateral (Figura 14A-B), además de una caída en el aumento de peso corporal en contraste a los animales Sham (Figura 14C).

Los resultados obtenidos mostraron que el edema de la extremidad posterior inoculada de los animales tratados con DCA mantuvo la diferencia significativa con la extremidad posterior contralateral desde el 1 dpi hasta el 13 dpi (Figura 26A), lo cual sugiere que el DCA no tendría efectos antiinflamatorios locales.

Con respecto a la evolución del peso corporal de los animales con dolor inflamatorio y tratados con DCA, comparado con el de los animales inyectados y tratados con vehículo (13 dpi) mostró un aumento significativo del mismo hacia el final del tratamiento (Figura 26B).

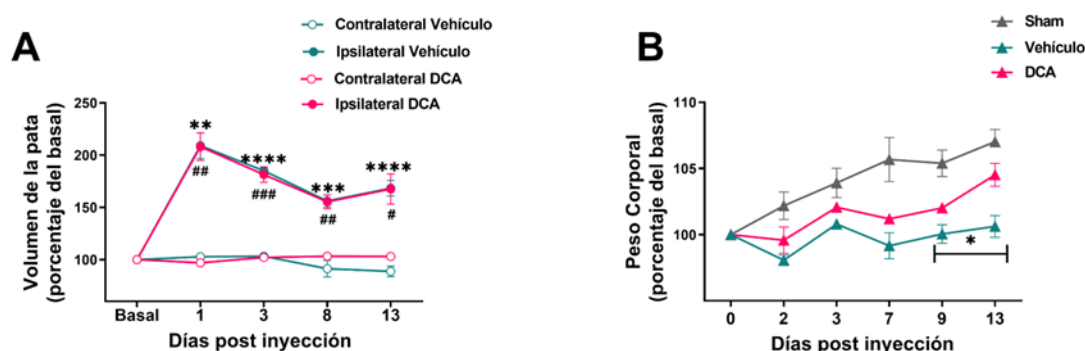


Figura 26. El dicloroacetato no modifica el edema de la extremidad posterior inyectada, pero si el peso corporal de los animales con inyección de adyuvante completo de Freud. A) Gráfico de la evolución temporal del volumen de las patas posteriores, calculado como se explica en la sesión de materiales y métodos. **B)** Gráfico del seguimiento del peso corporal de los animales a lo largo del estudio. ANOVA-RM de dos vías, para efectos del tratamiento: Volumen de la pata: $P < 0,0001$, $F_{3,20} = 98,56$; peso corporal: $P = 0,0046$, $F_{2,6} = 15,03$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ significativamente diferentes de la extremidad posterior contralateral (vehículo o DCA) o del animal sham. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$ significativamente diferentes a la extremidad posterior ipsilateral del vehículo o al animal inyectado vehículo. DCA, dicloroacetato; ANOVA-RM, análisis de varianza de medidas repetidas. $n = 6$ animales por grupo.

8) *IMPACTO DEL DICLOROACETATO SOBRE LA REACTIVIDAD GLIAL EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON LESIONES QUE PROVOCAN DOLOR CRÓNICO*

Para analizar si el tratamiento con DCA altera la reactividad glial característica de los modelos de dolor crónico, se recurrió a técnicas de inmunofluorescencia utilizando marcadores GFAP e Iba-1 en el asta dorsal en el mismo punto temporal al que se midió la respirometría de alta resolución, 13 dpi en animales con dolor inflamatorio y 19 dpi en el dolor neuropático [187], [188], [192].

De acuerdo a lo reportado [40], los astrocitos inmunomarcados con GFAP exhibieron un aumento en el tamaño del soma y en el grosor de sus prolongaciones, observable a simple vista, lo cual coincide con un incremento en la intensidad de fluorescencia para GFAP. Las imágenes de microscopía confocal obtenidas del asta dorsal de la médula espinal de animales con dolor inflamatorio revelaron que la administración de DCA modificó la morfología tanto de astrocitos (Figura 27A). La cuantificación de dichas imágenes demostró que el DCA indujo una profunda disminución en el área ocupada por la inmunofluorescencia de GFAP en el asta dorsal ipsilateral, comparado a lo observado en los animales tratados con vehículo (Figura 27B).

En lo que refiere a la inmunoreactividad de Iba-1, las imágenes adquiridas mostraron la morfología típica de microglías con un soma pequeño definido y varias prolongaciones cortas de trayectoria quebrada. En la región del asta dorsal ipsilateral a la lesión de animales tratados con DCA se observaron microglía con menos prolongaciones y menor intensidad de fluorescencia que en la región ipsilateral de los animales tratados con vehículo (Figura 27C). De manera similar a la inmunoreactividad para GFAP, el área ocupada por Iba-1 en el asta dorsal ipsilateral disminuyó después del tratamiento con DCA en contraposición con la misma región de las muestras de animales tratados con vehículo (Figura 27D).

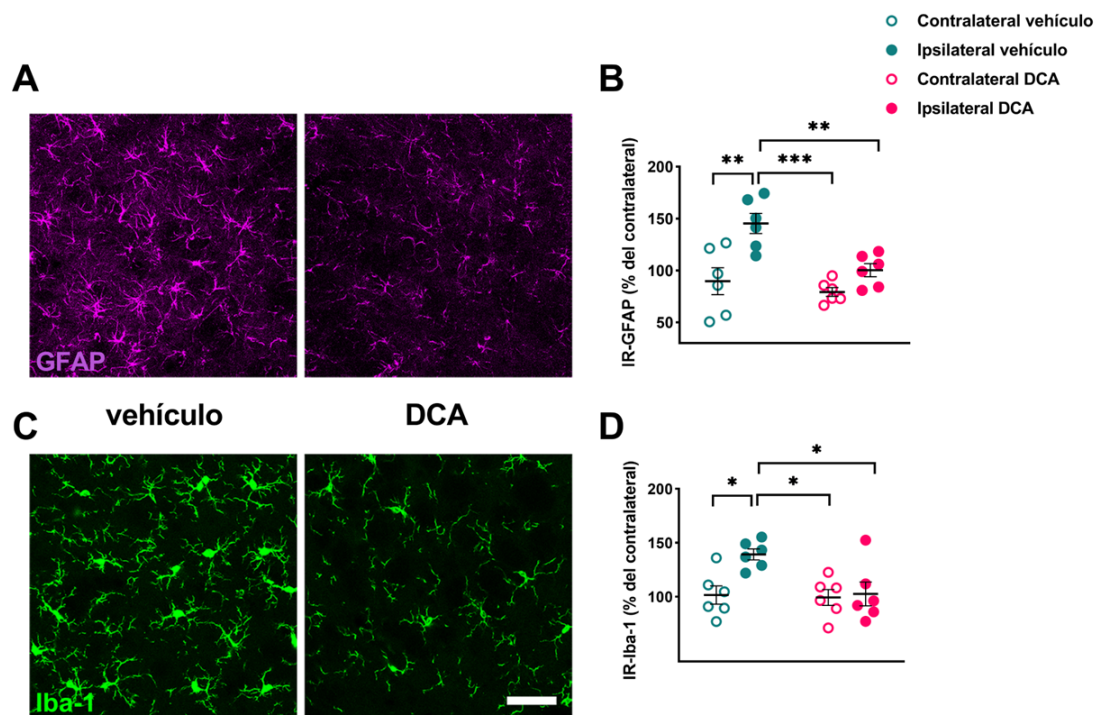


Figura 27. El dicloroacetato redujo la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1 en la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freud. A y C) Imágenes confocales representativas del inmunomarcado para GFAP (A) e Iba-1 (C) en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal a los 13 dpi. Barra de escala = 50 μ m. **B y C)** Cuantificación de la inmunoreactividad (IR) de GFAP (B) e Iba-1 (D). La gliosis se cuantificó en el asta dorsal ipsi y contralateral, midiendo el porcentaje del área total ocupada por la inmunofluorescencia para GFAP e Iba-1. Resultados de ANOVA unidireccional: GFAP: $P = 0,0002$, $F_{3,20} = 10,58$; Iba: $P = 0,0073$, $F_{3,20} = 5,328$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $***P < 0,001$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; dpi, días post inyección; ANOVA, análisis de varianza. $n = 6$ animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

Al igual que los hallazgos en los animales con dolor inflamatorio, la inmunoreactividad para GFAP en el asta dorsal ipsilateral de los animales con dolor neuropático tratados con DCA se redujo en comparación con la misma región de los animales tratados con vehículo. Además, los somas detectados con este marcador presentaron un menor tamaño, con prolongaciones más delgadas y menos abundantes (Figura 28A). Estas observaciones fueron confirmadas con la cuantificación de las imágenes, en las cual se evidenció una significativa disminución de la inmunoreactividad para GFAP del asta dorsal ipsilateral de los animales con DCA en comparación con su región homóloga en los animales tratados con vehículo (Figura 28B).

El tratamiento con DCA también modificó la inmunomarcación de la microglía. Se evidenció una disminución en las prolongaciones celulares y menor intensidad de la fluorescencia para Iba-1 en el asta dorsal ipsilateral a la lesión (Figura 28C). La cuantificación de las imágenes ratificó que el DCA disminuyó de manera significativa la inmunoreactividad para

Iba-1 en el asta dorsal ipsilateral, respecto a la de animales tratados con vehículo (Figura 28D).

Cabe destacar que, en ambos modelos de dolor crónico, no se observaron diferencias en la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1 de las astas dorsales contralaterales entre los animales tratados con DCA o vehículo (Figura 27B y 28B).

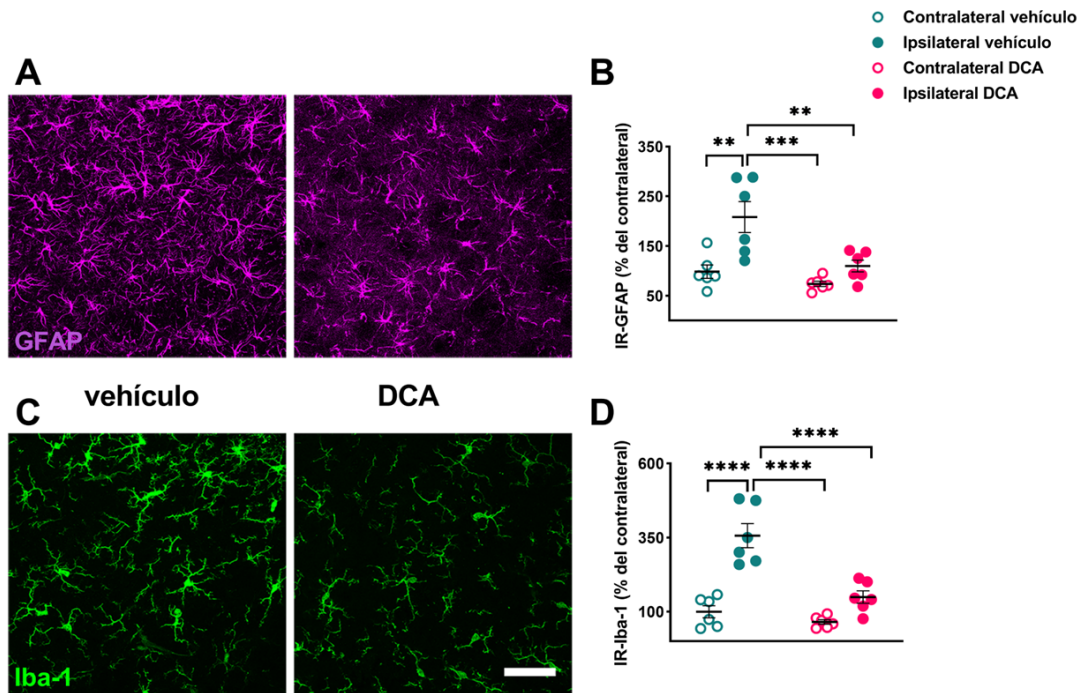


Figura 28. El dicloroacetato redujo la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1 en la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático. A y C) Imágenes confocales representativas del inmunomarcado para GFAP (A) e Iba-1 (C) en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal a los 19 dpl. Barra de escala = 50 μ m. **B y C)** Cuantificación de la inmunoreactividad (IR) de GFAP (B) e Iba-1 (D). La gliosis se cuantificó en el asta dorsal ipsi y contralateral, midiendo el porcentaje del área total ocupada por la inmunofluorescencia para GFAP e Iba-1. Resultados de ANOVA unidireccional: GFAP: $P = 0,0002$, $F_{3,20} = 10,59$; Iba: $P < 0,0001$, $F_{3,20} = 26,51$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 6$ animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

9) EFECTO DEL DICLOROACETATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON LESIONES ASOCIADAS A DOLOR CRÓNICO

En modelos animales de dolor crónico, los cambios morfológicos de las células gliales en la médula espinal son acompañados por un aumento en los niveles de expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias [40]. Con el propósito de evaluar si los niveles de ARNm de citoquinas se modificaron por el tratamiento con DCA, se midieron los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β y TNF- α mediante Q-PCR, al mismo momento en que realizaron los ensayos de función mitocondrial, 13 dpi en animales con dolor inflamatorio y 19 dpi en animales con dolor neuropático.

En comparación con muestras de la médula de animales naïve, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm de IL-1 β o TNF- α en las muestras de médula espinal lumbar ipsilateral de animales con dolor inflamatorio tratados con vehículo. De igual forma, tampoco se observan diferencias con la administración oral de DCA (Figura 29 A-B).

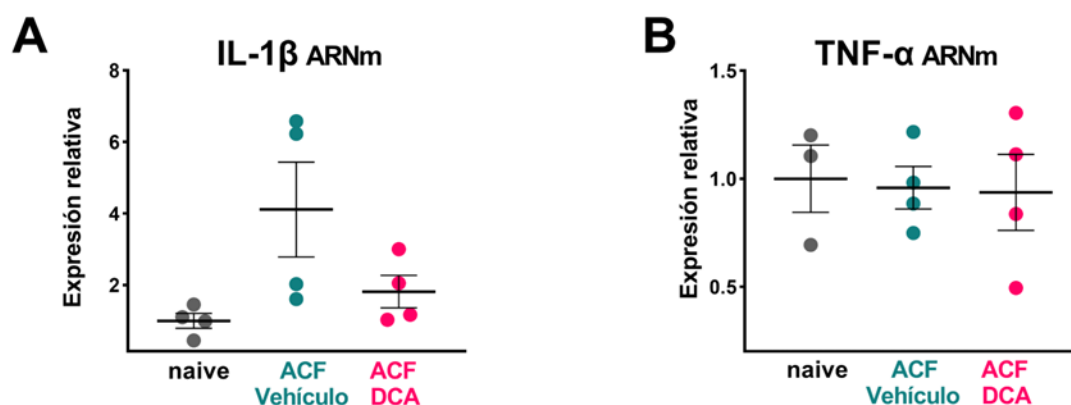


Figura 29. El tratamiento con dicloroacetato no modificó la expresión de ARNm de IL-1 β y TNF- α en la médula espinal de animales con inyección de adyuvante completo de Freund. Expresión relativa de las citoquinas IL-1 β (A) y TNF- α mRNA (B) mediante Q PCR a los 13 dpi. La cuantificación de Q PCR se realizó con el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando la médula espinal ipsilateral a la inyección o naïve. El ARNm de GAPDH se utilizó como referencia. Resultados de ANOVA unidireccional: IL-1 β : $P = 0,0612$, $F_{2,9} = 3,872$; TNF- α : $P = 0,9580$, $F_{2,8} = 0,04312$. DCA, dicloroacetato; ACF, Adyuvante Completo de Freund Q PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa; dpi, días post inyección; ANOVA, análisis de varianza. $n = 4$ animales por grupo.

En el caso de las muestras procedentes de la médula espinal lumbar ipsilateral de animales con dolor neuropático, la cuantificación de la expresión relativa de IL-1 β y TNF- α no mostró cambios significativos entre los animales naïve y lesionados. En este modelo, el DCA tampoco modificó el patrón de expresión de IL-1 β ni de TNF- α (Figura 30 A-B).

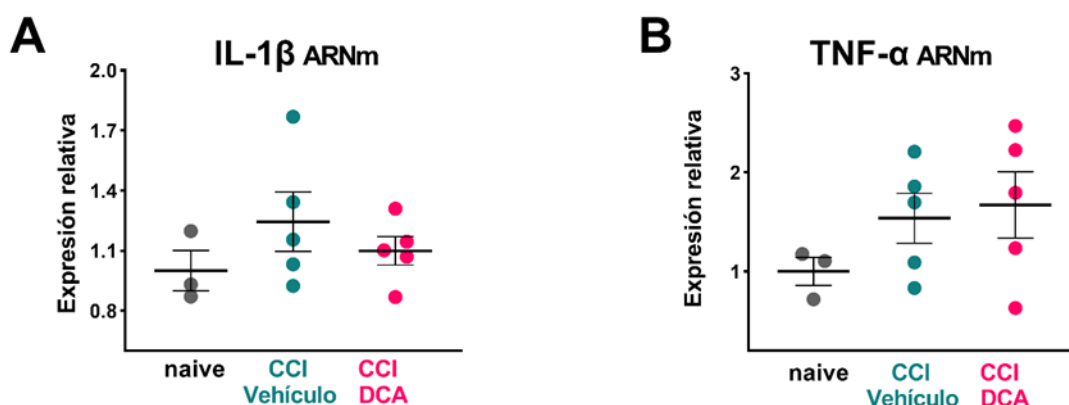


Figura 30. El tratamiento con dicloroacetato no modificó la expresión de ARNm de IL-1 β y TNF- α en la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático. Expresión relativa de las citoquinas IL-1 β (A) y TNF- α mRNA (B) mediante Q PCR a los 19 dpl. La cuantificación de Q PCR se realizó con el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando la médula espinal ipsilateral a la lesión o naïve. El ARNm de GAPDH se utilizó como referencia. Resultados de ANOVA unidireccional: IL-1 β : $P = 0,3992$, $F_{2,10} = 1,008$; TNF- α : $P = 0,3356$, $F_{2,10} = 1,220$. DCA, dicloroacetato; CCI, contricción crónica del nervio ciático Q PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 3-5$ animales por grupo.

Los resultados hasta aquí presentados, forman parte de un manuscrito publicado en la revista "PAIN" de la International Association for the Study of Pain (IASP) (doi: 10.1097/j.pain.0000000000001992).

CAPÍTULO II: ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA NEUROPLASTICIDAD EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO Y SUS MODIFICACIONES FRENTE AL TRATAMIENTO CON DICLOROACETATO

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en la relación entre los cambios en la actividad respiratoria mitocondrial encontrados en la médula espinal de animales con dolor crónico y las modificaciones en los comportamientos algésicos tras la modulación metabólica con DCA, se estudiaron distintos aspectos de la neuroplasticidad desde un enfoque morfológico, aplicando técnicas de inmunofluorescencia. Como ya se ha expuesto anteriormente, la cronificación del dolor requiere de mecanismos de neuroplasticidad a nivel del asta dorsal de la médula espinal, que reciben el nombre de Sensibilización Central [81]. Algunos de los factores que participan en la neuroplasticidad incluyen los componentes de la MEC del tejido nervioso y variaciones en la expresión de proteínas asociadas a las sinapsis [147], [148], [296], [297].

1) ANÁLISIS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO Y SU MODULACIÓN POR DICLOROACETATO.

Con el fin de analizar si la función mitocondrial afecta la MEC, estudiamos la expresión de agrecano, uno de los componentes predominantes de la MEC y en particular de las RPNs [298], en las regiones correspondientes a las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal, a distintos puntos temporales luego de la intervención quirúrgica (3, 7 y 19 dpl).

Al análisis en el microscopio confocal se detectó una inmunoreactividad positiva para agrecano. Además de la inmunoreactividad de fondo correspondiente a su distribución difusa en la MEC, se observó la organización formando mallas o redes alrededor de los somas neuronales con variada intensidad según las regiones de sustancia gris. Para este estudio, nos concentramos en la inmunoreactividad en las láminas I y II del asta dorsal, de

acuerdo a la distribución de los somas neuronales en cortes paralelos teñidos con Nissl. Al medir la intensidad media de fluorescencia de la inmunoreactividad para agrecano en los animales lesionados, se observó una disminución significativa en la inmunoreactividad para a los 7 dpl y 19 dpl en la hemimédula ipsilateral a la lesión en comparación con los animales naïve (Figura 31). La administración oral de DCA previno la reducción de la inmunoreactividad para agrecano de manera significativa, en comparación a los animales lesionados tratados con vehículo. La modulación metabólica con DCA, no solo evitó la disminución de los niveles de expresión de dicho marcador, si no que los mantuvo constantes en el tiempo, y similares a los obtenidos para los animales naïve (Figura 31).

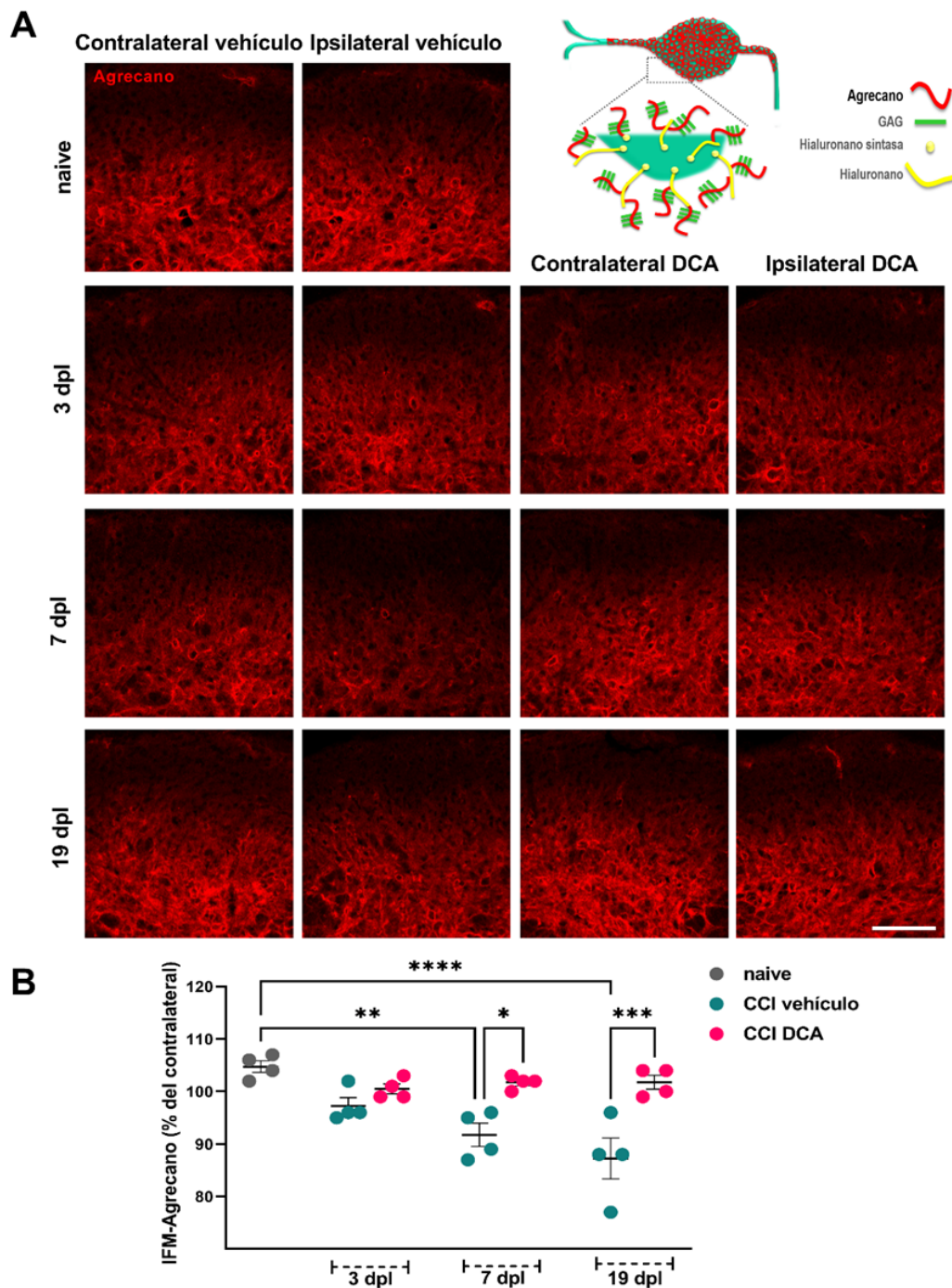


Figura 31. La expresión de agrecano disminuyó en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático, lo cual se previno con la administración de dicloroacetato. A) Imágenes confocales representativas del inmunomarcado de agrecano en el asta dorsal de la médula espinal a nivel de las láminas I-II contra e ipsilateral a la lesión en los días indicados. Barra de escala = 100 μ m. En el sector derecho superior se esquematiza la ubicación del agrecano con respecto a otros componentes de MEC. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida (IFM) de agrecano a los 3, 7 y 19 dpl en la región mencionada. Resultados de ANOVA unidireccional: $P < 0,0001$, $F_{6,21} = 10,17$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $****P < 0,0001$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; CCI, contricción crónica del nervio ciático; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 4$ animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

2) *EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SINAPSIS inhibitoras EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO Y SU MODULACIÓN CON DICLOROACETATO*

Con el fin de estudiar los niveles de expresión de marcadores de componentes sinápticos inhibitoras y el impacto del DCA sobre ellos, se utilizó GAD67 como marcador de componentes presinápticos GABAérgicos, una enzima responsable de la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA [299].

Se observó una marca inmunoreactiva concentrada alrededor de los somas neuronales y en el neuropilo de las regiones de la lámina I y II del asta dorsal de la médula espinal, compatible con lo reportado anteriormente [134], [300], [301], [302]. Las imágenes obtenidas y las cuantificaciones correspondientes, evidenciaron una reducción significativa de la inmunoreactividad para GAD67 a los 7 dpl y 19 dpl en el asta dorsal de la hemimédula ipsilateral a la lesión en los animales con dolor neuropático, en comparación con los animales naïve (Figura 32). Sin embargo, la modulación metabólica con DCA previno la disminución en la inmunoreactividad a GAD67 a los 7 dpl y 19 dpl (Figura 32B), manteniendo los niveles de expresión del marcador en valores similares a los de los animales naïve (Figura 32B).

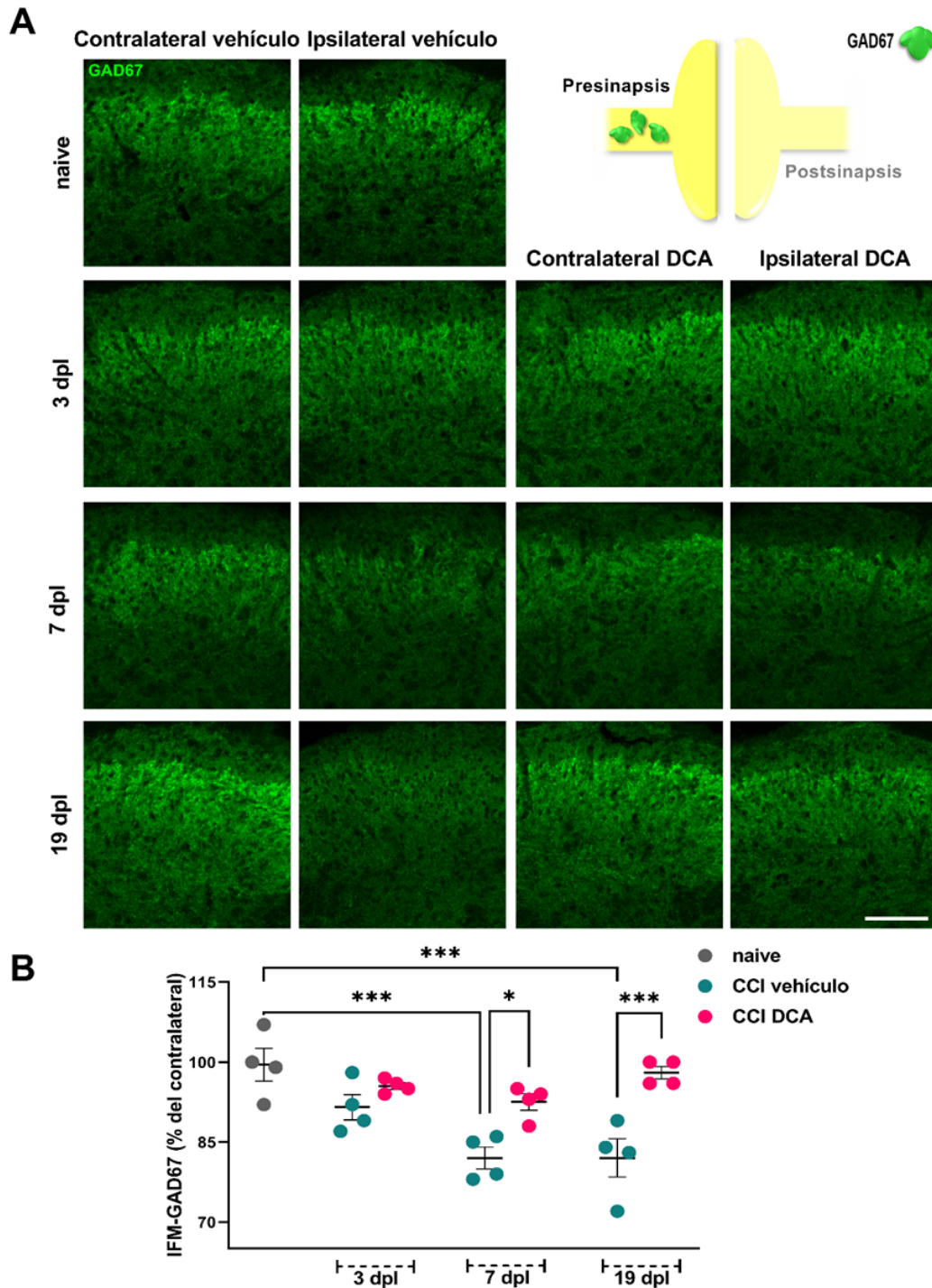


Figura 32. La expresión de la enzima GAD67 disminuyó en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático, y se revirtió tras el tratamiento con dicloroacetato. A) Imágenes confocales representativas del inmunomarcado de GAD67 en el asta dorsal de la médula espinal a nivel de las láminas I-II contra e ipsilateral a la lesión como se indica, a los 19 dpl. Barra de escala = 100 μ m. En el sector derecho superior se observa la representación esquemática de su ubicación. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida (IFM) de GAD67 a los 3, 7 y 19 dpl en la región mencionada. Resultados de ANOVA unidireccional: $P < 0,0001$, $F_{7,24} = 240,3$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$ y $***P < 0,001$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; CCI, contricción crónica del nervio ciático; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 4$ animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

3) *EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SINAPSIS exitadoras EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO Y SU MODULACIÓN CON DICLOROACETATO*

Otro factor implicado en los mecanismos subyacentes a la neuroplasticidad, es la transmisión sináptica excitatoria [303], [304], [305]. En el asta dorsal de la médula espinal de modelos de dolor crónico, en donde tras la injuria (central o periférica) las transmisiones sinápticas exitadoras predominantes son glutamatérgicas [306], [307], es característico el aumento en la expresión del marcador presináptico VGLUT2 y del postsináptico PSD95 [105], [308], [309], [310]. Para evaluar si la modulación metabólica con DCA, modifica la expresión de VGLUT2 y PSD95 se analizaron inmunotransferencias en proteínas totales de la hemimédula espinal ipsilateral de animales con dolor neuropático a los 19 dpl y de animales naïve, tratados con DCA o con vehículo.

La observación primaria de las imágenes obtenidas mostraron la presencia de una banda muy notoria correspondiente a VGLUT2 en las muestras de animales con dolor neuropático tratados con vehículo, en comparación con las provenientes de animales naïve (Figura 33A). La cuantificación de la densidad de las bandas de este marcador presináptico mostraron un aumento significativo de la expresión relativa de VGLUT2 en muestras de animales lesionados tratados con vehículo, respecto a los animales naïve. Además, en aquellos animales tratados con DCA la banda fue significativamente de menor densidad que en los animales con dolor neuropático tratados con vehículo (Figura 33B).

En el caso del marcador postsináptico PSD95, las imágenes mostraron bandas definidas correspondientes al peso molecular de la PSD95 en los tejidos de animales lesionados pero casi indistinguibles en los tejidos de animales naïve (Figura 33A). El análisis densitométrico de las bandas mostró un aumento significativo en los tejidos de animales con dolor neuropático en comparación con el grupo naïve, pero no se observaron modificaciones con el tratamiento con DCA (Figura 33C).

Es importante destacar que la modulación metabólica en los animales naïve no afectó los niveles de expresión relativa en la médula espinal de ninguno de los dos marcadores sinápticos estudiados (Figura 33).

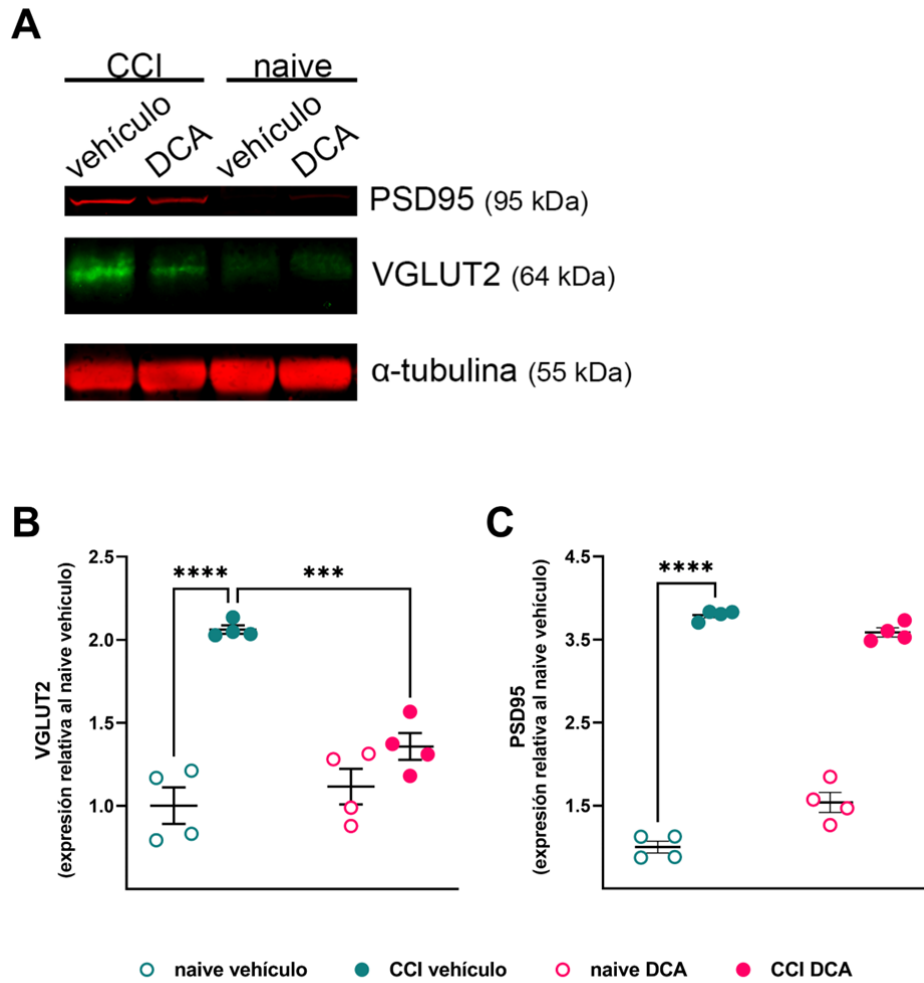


Figura 33. Los niveles de expresión de VGLUT2 y PSD95 aumentaron en la médula espinal ipsilateral tras la lesión por contricción crónica del nervio ciático. **A)** Imagen representativa de una inmunotransferencias de muestras de médula espinal L4-6 ipsilateral a la lesión y naïve, para VGLUT2, PSD95 y α -tubulina. Los animales fueron tratados con DCA o vehículo como se indica en la sección de materiales y métodos. **B-C)** Cuantificación de los niveles relativos densitométricos de PSD95 (B) y VGLUT2 (C), normalizados frente al vehículo sin tratamiento. La α -tubulina se utilizó como referencia. Las muestras fueron obtenidas a los 19 dpl. Resultados de ANOVA unidireccional: PSD95: $P < 0.0001$, $F_{3,12} = 339,10$; VGLUT2: $P < 0.0001$, $F_{3,12} = 29,56$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ significativamente diferentes entre los indicados. CCI, contricción crónica del nervio ciático; DCA, dicloroacetato; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 4$ animales por grupo.

Con el propósito de estudiar la organización de las sinapsis glutamatérgicas en la médula espinal, y sus posibles modificaciones tras el tratamiento con DCA, se realizó inmunofluorescencia para los marcadores presináptico VGLUT2 y postsináptico PSD95 respectivamente, en secciones de médula espinal lumbar. Posteriormente, se realizó un análisis mediante microscopía confocal del asta dorsal. Para esto, se adquirieron un

conjunto de imágenes apiladas (z-stacks) de las regiones de las láminas I-II del asta dorsal de la médula espinal, tanto en animales con dolor neuropático a los 19 dpl como naïve.

Las imágenes adquiridas mostraron que ambos marcadores presentaron el aspecto de partículas puntiformes característico, similar al reportado en la literatura [291], y exhibieron una distribución homogénea en el área estudiada, tanto en los animales naïve como en los animales lesionados. En el asta dorsal ipsilateral de animales lesionados tratados con vehículo, se observaron algunas aglomeraciones del marcador sináptico PSD95 alrededor de núcleos marcados con DAPI (Figura 34).

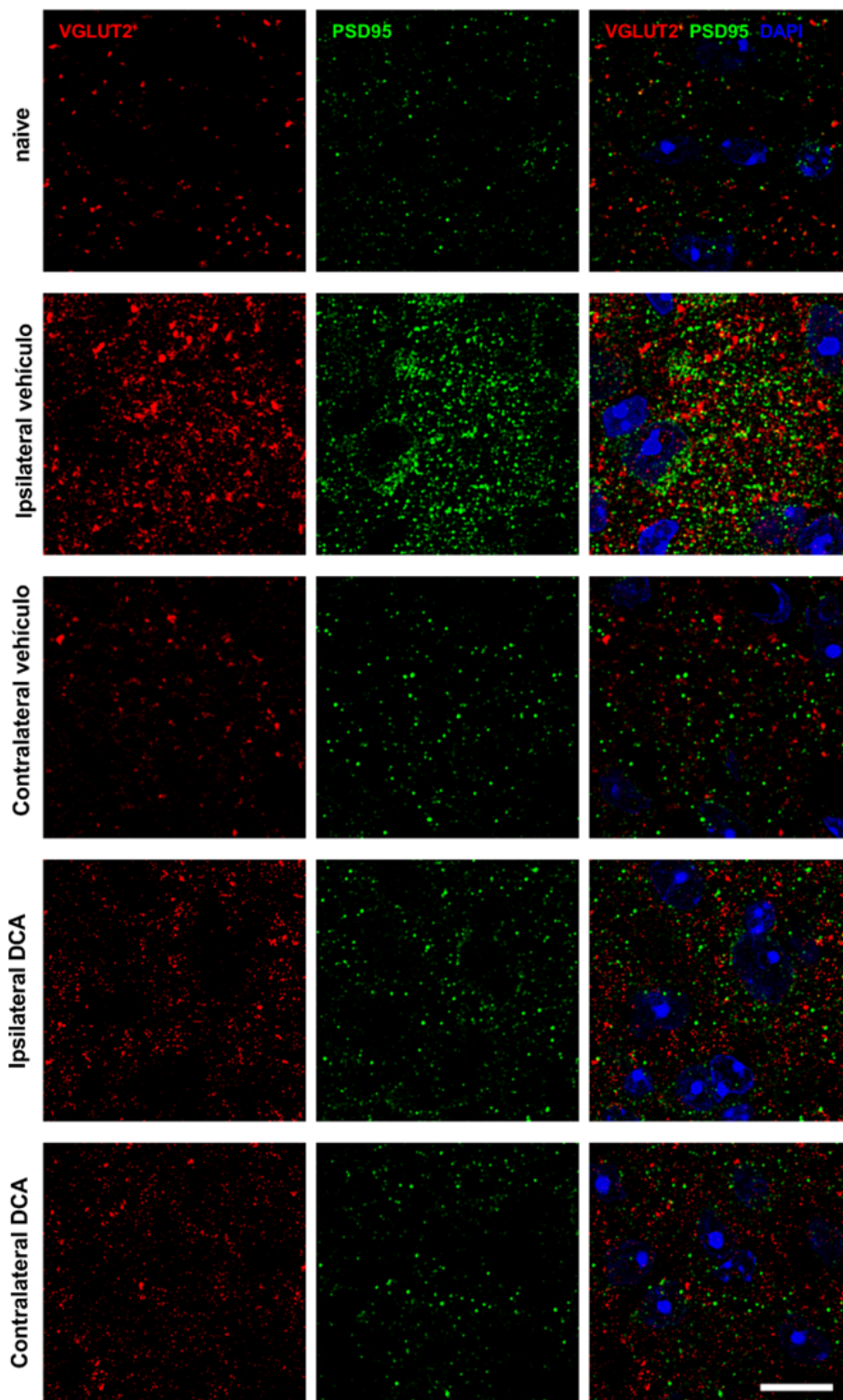


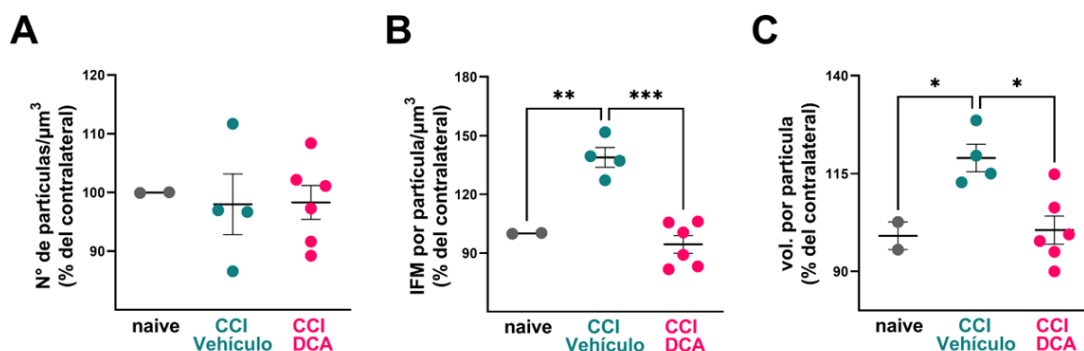
Figura 34. El dicloroacetato revirtió el aumento en la expresión de VGLUT2 y PSD95 en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático. Imágenes confocales representativas del inmunomarcado para VGLUT2 (imágenes en la región izquierda del panel) y PSD95 (imágenes en la región medial del panel) en el asta dorsal de la médula espinal a nivel de las láminas I-II contra e ipsilateral a la lesión como se indica, a los 19 dpl. Las imágenes de la región derecha del panel muestran la fusión de ambos marcadores y DAPI. Barra de escala = 10 μ m. DCA, dicloroacetato; dpl, días post lesión. n = 2-6 animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

La cuantificación se realizó mediante un análisis tridimensional, utilizando un programa (Macro) desarrollado por nuestro equipo para el análisis automatizado en los z-stacks del número, volumen e intensidad de fluorescencia media, por partícula VGLUT2 o PSD95 positiva por μm^3 con el software FIJI (NIH), como se detalla en la sección de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos evidenciaron que, a pesar de no existir diferencias en la densidad de las partículas VGLUT2 y PSD95 positivas (Figura 35A y D), la intensidad de fluorescencia media por partícula en el z-stacks, tanto para VGLUT2 como para PSD95, fue significativamente mayor en las astas dorsales ipsilaterales de los animales lesionados tratados con vehículo, que en el asta dorsal de animales naïve (Figura 35B y E). En cambio, el tratamiento sistémico con DCA previno el aumento en la intensidad de fluorescencia media en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal de los animales con dolor neuropático (Figura 35B y E).

En lo que respecta al volumen de las partículas, en el asta dorsal de la médula espinal de los animales lesionados tratados con vehículo, se evidenció un incremento significativo en los volúmenes de las partículas VGLUT2 y PSD95 positivas, en comparación con los animales naïve (Figura 35C y F). En este caso, al igual que lo observado para la intensidad de fluorescencia media de los marcadores pre y postsinápticos, el DCA previno el aumento en el volumen de las partículas VGLUT2 y PSD95 positivas, manteniéndolos similares a las observadas en los animales naïve (Figura 35C y F).

VGLUT2



PSD95

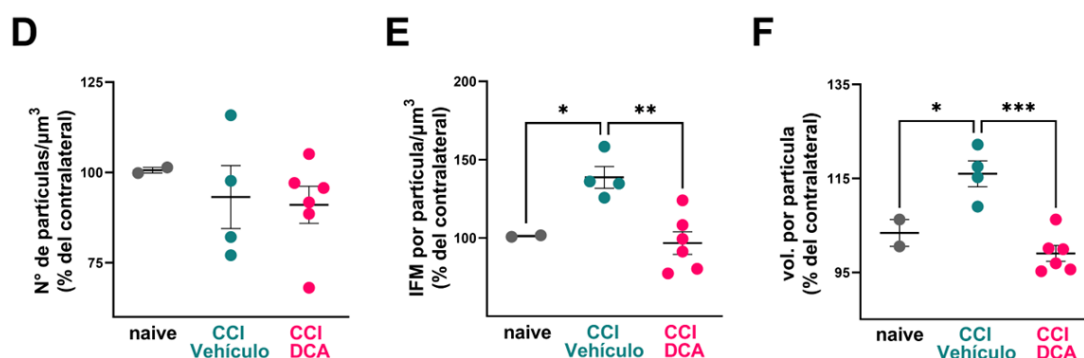


Figura 35. El dicloroacetato previno el aumento de la intensidad de fluorescencia medida y el volumen de las partículas VGLUT2 y PSD95 en las láminas I-II de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático. A-C) Cuantificación del número (N°) de partículas VGLUT2 positivas (A), y su intensidad de fluorescencia media (IFM) (B) y volumen (vol.) (C), a los 19 dpl, dentro de los z-stak adquiridos con microscopía confocal y medidos con el macro como se indica en la sesión de materiales y métodos. Resultados de ANOVA unidireccional VGLUT2: N° de partículas: $P = 0,9570$, $F_{2,9} = 0,04421$. IFM: $P = 0,0002$, $F_{2,9} = 24,37$. Vol.: $P = 0,0117$, $F_{2,9} = 7,592$. **D-F)** Cuantificación del N° de partículas PSD95 positivas (D), y su IFM (E) y vol. (F), a los 19 dpl, dentro de los z-stak adquiridos con microscopía confocal. Resultados de ANOVA unidireccional PSD95: N° de partículas: $P = 0,7051$, $F_{2,9} = 0,3633$. IFM: $P = 0,0061$, $F_{2,9} = 9,451$. Vol.: $P = 0,0010$, $F_{2,9} = 16,52$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $***P < 0,001$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; CCI, contricción crónica del nervio ciático; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 2-6$ animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

Para establecer con mayor precisión si las partículas VGLUT2 y PSD95 formaban parte de sinapsis, decidimos cuantificar aquellas que compartían píxeles entre sí denominándose contactos VGLUT2-PSD95 (Figura 36A). De estos contactos VGLUT2-PSD95, se midieron el número por unidad de volumen y la intensidad de fluorescencia media de cada una de las partículas involucradas en dichos contactos. Se detectó un aumento significativo en la densidad de contactos VGLUT2-PSD95, en el asta dorsal ipsilateral a la lesión, con

respecto al lado contralateral. La modulación metabólica con el DCA previno dicho aumento en el asta dorsal, llevando el número de contactos a valores semejantes a los de animales naïve (Figura 36B).

Al analizar la intensidad de fluorescencia media de las partículas VGLUT2 involucradas en los contactos, se observó que, efectivamente, la lesión por CCI induce un aumento significativo, contrastando con lo observado en los animales naïve y en el lado contralateral de los animales lesionados (Figura 36C). De igual manera, la intensidad de fluorescencia media de las partículas PSD95 que formaban parte de los contactos, aumentó significativamente en el asta dorsal ipsilateral de los animales lesionados, en comparación con los animales naïve y el asta dorsal contralateral. En este caso, el tratamiento con DCA también previno, de manera significativa, el incremento en la intensidad de fluorescencia media de las partículas PSD95 de los contactos en el asta dorsal ipsilateral de los animales tratados con vehículo, asemejándose a la de animales naïve y regiones contralaterales (Figura 36D).

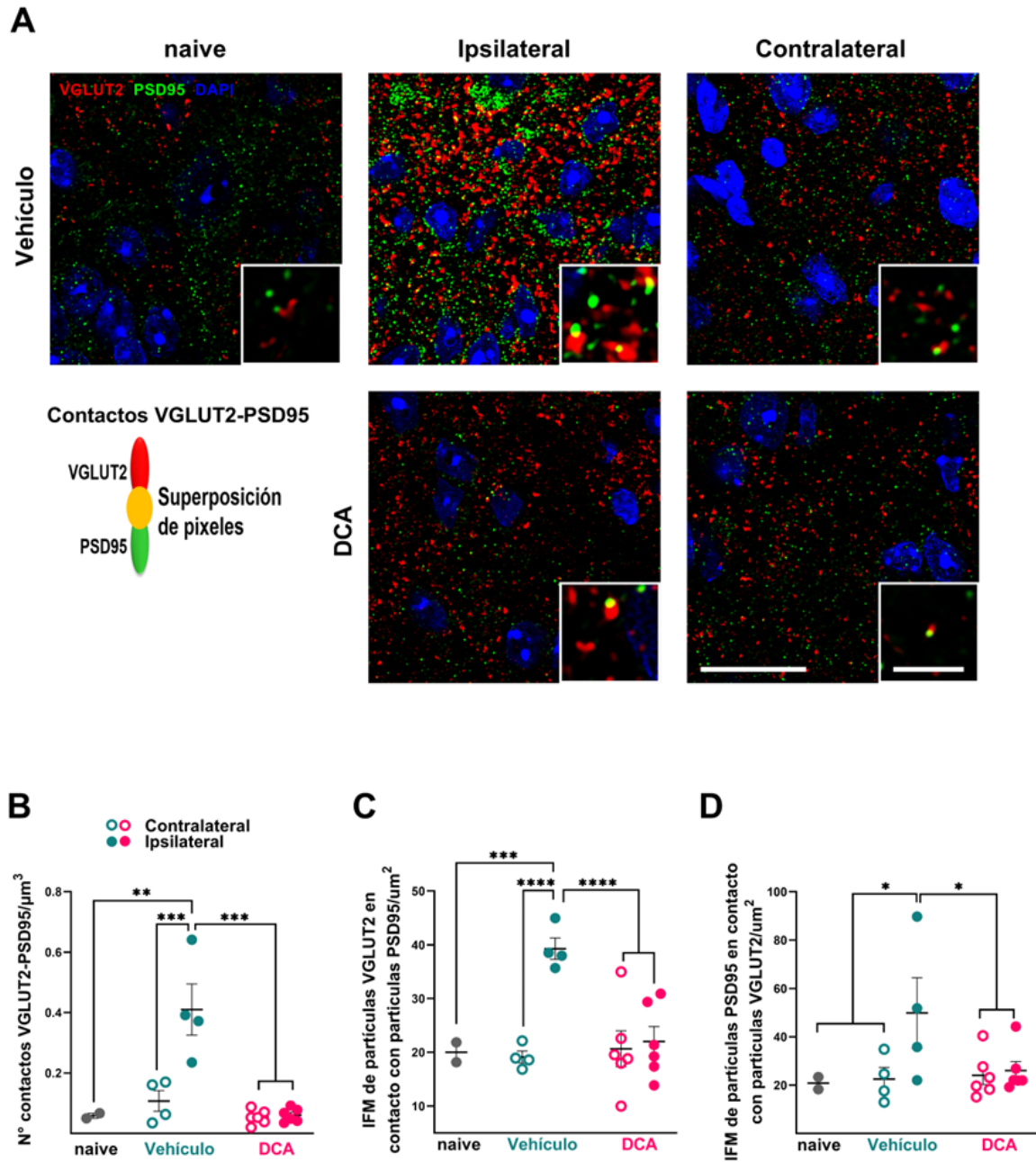


Figura 36. El dicloroacetato reduce el número de contactos VGLUT2-PSD95, al igual que la intensidad de fluorescencia media y el volumen de las partículas involucradas, en el sitio ipsilateral a la lesión de la médula espinal de animales con contricción crónica del nervio ciático. A) Imágenes confocales representativas del inmunomarcado para VGLUT2, PSD97 y DAPI en el asta dorsal de la médula espinal a nivel de las láminas I-II contra e ipsilateral a la lesión, a los 19 dpl. Barra de escala = 20 μm . El recuadro más pequeño en la región inferior derecha de cada imagen se muestra a mayor aumento los contactos VGLUT2-PSD97 con su superposición de píxeles (amarillo). Barra de escala = 2,5 μm . En la región inferior izquierda del panel se muestra la representación esquemática de dichos contactos. **B-D)** Cuantificación del número (N°) de contactos VGLUT2-PSD95 (B), y de las intensidades de fluorescencia media (IFM) de VGLUT2 (C) y PSD95 (D), a los 19 dpl, dentro de los z-stack adquiridos con microscopía confocal y medidos con el macro como se indica en la sesión de materiales y métodos. Resultados de ANOVA unidireccional PSD95: N° de contactos: $P < 0,0001$, $F_{4,12} = 16,99$. IFM VGLUT2: $P < 0,0001$, $F_{4,12} = 23,23$. IFM PSD95: $P = 0,0101$, $F_{4,12} = 5,399$. Resultados del test de comparación múltiple de Tukey: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ significativamente diferentes entre los indicados. DCA, dicloroacetato; dpl, días post lesión; ANOVA, análisis de varianza. $n = 2-6$ animales por grupo (10 cortes de médula espinal por animal).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha abordado el estudio del papel de la función respiratoria mitocondrial en el desarrollo de la sensibilización central. Mediante respirometría de alta resolución, hemos identificado que la función respiratoria mitocondrial está disminuída en la médula espinal de animales sometidos a dolor crónico. Asimismo, observamos que la estimulación de la función mediante el uso de DCA tiene un impacto beneficioso en el umbral del dolor. Además de reducir la hipersensibilidad al dolor, la mejoría en la función respiratoria mitocondrial se acompaña de una disminución en la reactividad glial y en un restablecimiento de los niveles de expresión de marcadores de actividad sináptica excitatoria, inhibitoria y de componentes de la MEC.

Estos estudios se realizaron en dos modelos preclínicos de dolor crónico: uno de dolor inflamatorio, mediante la inyección intraplantar de ACF, y otro de dolor neuropático, inducido por la constricción crónica del nervio ciático. Ambos, ampliamente utilizados en la literatura científica [34], [40], [43], fueron puestos a punto en nuestro laboratorio para el desarrollo de esta tesis y se caracterizaron a través de diversas mediciones y observaciones. Nuestros resultados sobre la reactividad glial, hiperalgesia y alodinia se alinean con reportes previos para estos modelos [38], [40], [311], [312] [40], [198], [199], [209]. En estos modelos, incluimos por primera vez la medición de respirometría en muestras intactas de tejido fresco de médula espinal.

FUNCIÓN RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN CONTEXTOS DE DOLOR CRÓNICO

La fosforilación oxidativa es tradicionalmente estudiada en mitocondrias aisladas donde la disponibilidad de sustratos y factores pueden ser manipulados a voluntad y el consumo de oxígeno se observa en tiempo real. Estos estudios desestiman la influencia del contexto celular y tisular. Un avance singular en este sentido se obtuvo al protocolizar los estudios de respirometría en biopsias de tejido fresco [289]. Un aporte fundamental de esta tesis consistió en el registro del consumo de oxígeno en muestras de médula espinal en el contexto del dolor crónico. Se detectó una disminución en la mayoría de los parámetros bioenergéticos en la médula espinal de los animales lesionados en ambos modelos, en

comparación con los animales naïve. Es importante subrayar que, en el caso del modelo de dolor inflamatorio por inyección de ACF, se detectaron reducciones en los valores de los parámetros bioenergéticos en la hemimédula espinal lumbar ipsilateral al daño, en comparación con el lado contralateral del mismo animal. Nuestros hallazgos sugieren que la disminución de la actividad respiratoria mitocondrial está estrechamente vinculada con la persistencia del dolor y los mecanismos asociados a su cronificación.

En la médula espinal de los animales lesionados en ambos modelos, si bien no hubo variaciones en el consumo de oxígeno en el estado 4 frente al agregado de succinato, encontramos valores significativamente más bajos para el estado 3, es decir, tras del agregado de ADP, en comparación con las muestras del control correspondientes. Esto indica que, aunque se observa consumo de oxígeno en presencia de sustratos, hay una reducción en el consumo de oxígeno destinado a la síntesis de ATP, sugiriendo que disminuye el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación del ADP a ATP en el complejo V. Asimismo, y en concordancia con lo anterior, los valores de la respiración dependiente de la síntesis de ATP fueron significativamente menores en la médula espinal de los animales lesionados en comparación con los controles. Esto refuerza la hipótesis de que la síntesis de ATP se encuentra desacoplada del transporte de electrones en la médula espinal de animales que presentan dolor crónico. Esta situación podría ser atribuible a una disfunción en la actividad del complejo V o a alteraciones en su interacción con los demás complejos de la cadena respiratoria. Los complejos respiratorios pueden ensamblarse en estructuras mayores, denominadas supercomplejos, lo cual ha demostrado aumentar la eficiencia del transporte de electrones. A su vez, el desensamblaje de estos supercomplejos reduce la eficiencia del transporte y aumenta la producción de EROs. Esto, en particular, ha sido demostrado en estudios comparativos entre astrocitos y neuronas, donde se muestra que los astrocitos tienen los complejos desensamblados, respiran peor y producen más EROs con respecto a las neuronas que los tienen más compactados en supercomplejos [313]. Asimismo, la reducción en la máxima capacidad respiratoria, alcanzable tras el agregado en bolos del desacoplante FCCP, sugiere que las mitocondrias no mantienen la reserva funcional. Este fenómeno podría deberse a deficiencias en los complejos I, III y IV para restaurar el gradiente electroquímico mitocondrial, e incluso a limitaciones para reclutar más complejos o sustituir componentes defectuosos [314], [315]. El desacoplamiento implica una reducción en la eficiencia de la síntesis de ATP; no obstante, podría representar un sistema de adaptación rápida a cambios ambientales. Tal adaptación permitiría una regulación más efectiva de procesos como la producción de calor, la generación de radicales libres y/o el transporte de diversos metabolitos a través de la MMI [316].

En conjunto, estos resultados indican que en las muestras de médula espinal de los animales afectados con dolor crónico las mitocondrias están más desacopladas y sintetizan menos ATP, lo cual puede estar restringiendo el suministro energético. Nuestros hallazgos respaldan los datos reportados que describen la participación de la mitocondria en el dolor patológico en otros niveles de la vía del dolor [234], [317], [318]. De hecho, se han encontrado alteraciones de la función mitocondrial en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, así como en los nervios periféricos en animales que recibieron quimioterapia o ligadura parcial de nervios [275], [319], [320].

Existe una correlación entre la dinámica mitocondrial y la función bioenergética. Esto significa que las mitocondrias alternan entre estructuras más alargadas, resultado de la fusión de dos o más organelos y con alta actividad respiratoria, y formas fragmentadas, consecuencia de la fisión, que son menos eficientes energéticamente [321]. Cuando se incrementa el estado bioenergético mediante la inhibición de la fisión mitocondrial, se observa una mejora en la alodinia mecánica, como se ha evidenciado en modelos de alodinia inducida por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [322], lo cual es consistente con nuestros resultados. En contraste, otros estudios han demostrado que no se producen modificaciones en la tasa de consumo de oxígeno en la médula espinal en presencia de sustratos mitocondriales y ADP a los 7 y 14 días posteriores a la lesión CCI en ratas [323]. Sin embargo, en estos estudios no se evaluó la respiración relacionada con la síntesis de ATP, un parámetro en el cual observamos diferencias significativas en nuestra investigación. Las discrepancias con nuestros resultados podrían atribuirse a diferencias inherentes a la especie utilizada o a variaciones en el procesamiento del tejido. En el estudio mencionado, las muestras fueron sometidas a homogeneización, lo cual puede comprometer la integridad mitocondrial y enmascarar posibles diferencias entre las muestras de interés y sus controles, mientras que nuestros estudios fueron realizados en fragmentos intactos de la médula espinal.

Se desconoce la causa exacta de la disminución de la actividad mitocondrial en la médula espinal en condiciones de dolor. Existen varios mecanismos que modulan la función respiratoria, en particular, los niveles elevados de NO inhiben la actividad respiratoria mitocondrial, y esto a su vez, incrementa la producción de EROs [322], [325]. Este fenómeno es particularmente relevante en el dolor crónico, dado que la producción de NO en la médula espinal está implicada en el procesamiento del dolor persistente [324]. De hecho, los inhibidores de los complejos de la cadena de transporte de electrones inducen hiperalgesia mecánica a través de un mecanismo mediado por EROs en ratones sin lesiones [325]. Además, se ha demostrado que los antioxidantes dirigidos a la mitocondria pueden prevenir las afecciones dolorosas [326], [327]. Sumado a esto, el daño tisular provocado por exceso de EROs induce neuroinflamación, que a su vez provoca la

activación de las células gliales [328], lo cual apoya la fuerte correlación entre la disfunción mitocondrial y la reactividad glial.

En este trabajo, sugerimos que la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal está asociada con cambios en la bioenergética mitocondrial en condiciones de dolor crónico, de manera similar a lo previamente descrito por nuestro grupo en modelos animales de ELA [269], [271]. En el presente estudio, se describen las alteraciones en la bioenergética mitocondrial en el momento donde se detectó mayor reactividad de los astrocitos en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal, donde se ubican las primeras sinapsis de la vía del dolor. Las aproximaciones experimentales que empleamos no nos permiten discriminar entre los diferentes tipos celulares, lo que dificulta la identificación del tipo celular específico responsable de la disminución de la función respiratoria mitocondrial. Sin embargo, varias características del metabolismo de los astrocitos nos sugieren que estos podrían ser en gran medida responsables de dicho fenómeno. Estas células tienen la capacidad de reprogramar su metabolismo de oxidativo a glucolítico sin comprometer su supervivencia, a diferencia de lo que ocurre en las neuronas [329]. Además, presentan diferentes niveles de expresión de las isoformas de PDK en comparación con las neuronas y la microglía [241], [250].

MODULACIÓN METABÓLICA COMO ESTRATEGIA PARA LA REDUCCIÓN DE LA HIPERSENSIBILIZACIÓN AL DOLOR

El hallazgo de que la función respiratoria mitocondrial disminuye en la médula espinal en el segmento relacionado con el dolor nos llevó a cuestionarnos qué efectos podría tener un aumento en la respiración mitocondrial sobre la hiperalgesia y la alodinia. Para ello utilizamos el DCA, un fármaco que ha sido empleado de manera segura en humanos para el tratamiento de mitocondriopatías congénitas y diversas modalidades de cáncer [330], [331]. Algunos estudios han reportado como efecto adverso del DCA una neuropatía periférica asociada con hiperalgesia térmica, observada con dosis cinco veces superiores y administradas durante períodos de tiempo más prolongados que las utilizadas en nuestra investigación [332]. Sin embargo, el tratamiento con DCA en dosis más reducida ha demostrado resultados beneficiosos en neuropatologías asociadas con disfunción

mitocondrial, tales como la ELA [254], [269], la enfermedad de Huntington [333] y el glioblastoma [334].

El tratamiento oral con DCA restauró el consumo de oxígeno y los parámetros bioenergéticos evaluados en los segmentos medulares de los animales con dolor, alcanzando niveles comparables a los de los animales naïve. Este hallazgo sugiere que las mitocondrias no presentan alteraciones irreversibles, sino que su actividad puede ser reprogramada en respuesta a un estímulo metabólico.

El blanco farmacológico del DCA es la PDK, que inhibe la actividad de la PDH mediante fosforilación [335], [336]. La PDH a su vez estimula la función respiratoria mitocondrial [239]. Como se esperaba, el tratamiento con DCA disminuyó los niveles de expresión de la pPDH en la médula espinal, tanto en los animales lesionados como en los naïve. Esto indica que, aunque la administración de DCA fue sistémica, se comprobó la inhibición efectiva de la PDK a nivel de la médula espinal. Se ha documentado que una o más isoformas de PDK aumentan su expresión y su actividad como respuesta a estímulos proinflamatorios, lo que se traduce en un aumento de los niveles de pPDH [337]. Sin embargo, nuestros estudios no revelaron cambios significativos en los niveles relativos de pPDH entre las médulas espinales de los animales lesionados y los naïve no tratados con DCA, lo cual sugiere que la fosforilación de la PDH no se modifica en los modelos experimentales evaluados. Otros estudios han encontrado un aumento relativo en los niveles de pPDH y en las isoformas PDK2 y PDK4, pero este aumento se ha observado en el sitio de inyección de ACF, y no en la médula espinal de ratones con dolor crónico inducido por la inyección de ACF [318].

La recuperación de la función respiratoria mitocondrial inducida por el DCA se vio acompañada de una reducción en la expresión de los marcadores gliales en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la injuria. Estos resultados coinciden con datos previos obtenidos por nuestro grupo en modelos de ELA (murinos que expresan la proteína SODG93A), donde también se observa una disminución de la función respiratoria mitocondrial relacionada al daño neuronal. En estos modelos, la inhibición de la PDK por el DCA provocó una disminución en la reactividad astrocitaria [238], [269] y microglial [254]. Además, en cultivos primarios de astrocitos obtenidos de animales Tg (SODG93A), que presentan una función mitocondrial disminuida, se logró mejorar el consumo de oxígeno mediante la inhibición de PDK con el uso de DCA [254], [269], o por silenciamiento específico de la isoforma astrocítica, PDK2 [338]. Por otro lado, se ha observado que el DCA también es capaz de revertir el fenotipo proinflamatorio de macrófagos en cultivo [318], así como la proliferación y neurotoxicidad de células gliales aberrantes con características de astrocitos y microglía [254]. Estos datos demuestran el impacto del metabolismo sobre el fenotipo inflamatorio de las células gliales responsables de la neuroinflamación [318], [339].

En concordancia con estos antecedentes, nuestros hallazgos apoyan la idea de que la reactividad glial y la función respiratoria mitocondrial están interrelacionadas en el contexto del dolor crónico. Estas asociaciones se han identificado en otras patologías en las que las alteraciones metabólicas en las células gliales inducen cambios estructurales y funcionales, junto con disfunción neuronal, lo que contribuye a la fisiopatología de los trastornos neurológicos [252].

El hecho de que la fracción de la PDH total en su forma fosforilada sea generalmente mayor en los astrocitos que en otras células del SNC [340], junto con la abundante presencia de mitocondrias en los extensos procesos finos de los astrocitos, que abarcan una proporción significativa de la superficie del SNC [252], posiciona a estos últimos como candidatos idóneos para la modulación metabólica mediante el DCA. Uno de los factores más relevantes que diferencia los perfiles metabólicos entre astrocitos y neuronas son los distintos niveles de expresión de las isoformas de la PDK. En las neuronas, el complejo de la PDH opera cerca de los niveles máximos, debido a sus bajos niveles de expresión de PDK, siendo las isoformas predominantes la PDK1 y PDK3 [241], [250]. De manera similar a las neuronas, la microglía expresa PDK1 y PDK3 [250]. Por el contrario, en los astrocitos, una gran proporción del complejo de la PDH se mantiene inhibido a través de la fosforilación de PDH, debido a los elevados niveles de expresión de PDK, principalmente las isoformas PDK2 y PDK4 [241], [250]. Esta hipótesis se ve respaldada por la mayor tasa de fosforilación observada en presencia de PDK2 (isoforma astrocitaria) en comparación con las otras isoformas, así como por la mayor sensibilidad al DCA de PDK2 y PDK4 en relación con PDK1 y PDK3 [341]. En concordancia con esto, los estudios de nuestro grupo han demostrado que el silenciamiento selectivo de PDK2 en astrocitos SODG93A en cultivo, es suficiente para reducir los niveles de pPDH y recuperar la función respiratoria mitocondrial, alcanzando niveles similares a los de los astrocitos no transgénicos [338].

A pesar de que el estado metabólico de los astrocitos los convierte en un blanco potencial para la acción del DCA, la microglía también podría verse afectada por este tratamiento, dado que experimenta una remodelación metabólica de oxidativa a glucolítica al transitar de un estado homeostático a uno reactivo. Por lo tanto, no podemos excluir este mecanismo. Aun con la reducción en la reactividad de microglía y astrocitos observada con el tratamiento con DCA, no se detectaron variaciones en los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β entre los diferentes grupos. Este hallazgo podría atribuirse a que las muestras se obtuvieron al final del tratamiento y no durante las fases agudas de la inflamación, en las cuales se ha reportado un aumento en los niveles de citoquinas [342]. Investigaciones anteriores realizadas en un modelo neuropático han demostrado que el aumento de TNF- α e IL-1 β en la médula espinal ocurre durante la primera semana posterior a la lesión, recuperándose niveles similares a los del grupo

control a partir del día 7 [342]. Por otro lado, otros estudios que reportaron un incremento en los niveles de citoquinas durante la fase crónica del modelo de inyección de ACF en ratas, emplearon una dosis de ACF superior a la utilizada en la presente investigación [40].

Un hallazgo relevante de nuestro trabajo es el que muestra que la modulación metabólica inducida por DCA tuvo un impacto significativo en la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica, resultando en una reducción de la hipersensibilidad al dolor en los dos modelos de dolor utilizados en el presente trabajo. Estos resultados son coherentes con investigaciones previas que han demostrado una relación entre el eje PDK/PDC y el desarrollo del dolor, utilizando ratones doble knockout que carecían de PDK2 y PDK4 en el modelo de inyección de ACF [318], [343]. En conjunto, nuestros hallazgos se alinean con los resultados reportados en estudios anteriores en modelos animales con dolor inducido por vincristina. En estos estudios, el tratamiento con MitoQ, que actúa selectivamente como antioxidante en las mitocondrias [344], no sólo atenuó el incremento en la producción de ERONs y las alteraciones en la ultraestructura de estos organelos en la médula espinal, sino que también redujo la reactividad glial en el asta dorsal de la médula espinal y la hipersensibilidad al dolor [283].

EFFECTO DEL DICLOROACETATO SOBRE LA SENSIBILIZACIÓN CENTRAL DE LA MÉDULA ESPINAL

Como se expuso anteriormente, nuestros hallazgos proporcionan información sobre los cambios bioenergéticos en la médula espinal donde las aferencias primarias hacen sinapsis con las neuronas secundarias en la vía del dolor. Asimismo, el restablecimiento de la función mitocondrial mediante DCA redujo la hiperalgesia y la alodinia mecánica, lo que sugiere que se modificaron ciertos aspectos de la sensibilización central en la médula espinal.

El tratamiento con DCA es sistémico, lo que implica que puede tener múltiples sitios de acción a lo largo de la vía del dolor. Se ha descrito que el DCA reduce la sensibilización periférica al disminuir los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias y la acumulación relativa de lactato en las extremidades posteriores de animales tras la inyección de ACF [318]. Con el objetivo de identificar efectos directos sobre la plasticidad sináptica en la médula espinal, investigamos la expresión de un componente de la MEC, así como la expresión de marcadores sinápticos excitatorios e inhibitorios.

El circuito clave responsable de convertir la percepción normal del tacto en alodinia mecánica se localiza en el asta dorsal de la médula espinal [81]. Tras una lesión en el nervio periférico, se producen tanto cambios sinápticos como no sinápticos que incrementan la sensibilidad de las neuronas somatosensoriales en el asta dorsal ante estímulos táctiles, lo que conduce a una sensibilización central [83]. Se han propuesto diversos mecanismos para impulsar la sensibilización central que conduce a hiperalgesia y alodinia. Estos incluyen un aumento en la excitabilidad de las sinapsis glutamatérgicas, una reducción en la actividad de las interneuronas inhibitorias locales y, más recientemente, modificaciones en la MEC [345], [346], [347], [348].

Mediante un abordaje morfológico de análisis de imágenes de microscopía confocal, investigamos la expresión de un componente de la MEC, así como la de marcadores sinápticos excitatorios e inhibitorios.

En el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la lesión, se observó una disminución en la expresión de agregano detectado por inmunofluorescencia. Sería necesario colocalizar con marcadores específicos de neuronas para garantizar una mayor precisión en la evaluación de la distribución de las RPNs. El agregano es un componente clave de la MEC y actúa como regulador en la homeostasis neuronal [175]. La reducción de su expresión en el contexto de lesiones del sistema nervioso podría implicar una alteración en el soporte estructural de los somas neuronales [159], [175], lo que, a su vez, podría contribuir a la hipersensibilidad al dolor observada en nuestro estudio. Esta hipótesis se respalda por investigaciones previas que indican que la degradación química de la MEC induce hipersensibilidad al dolor [348]. De acuerdo con nuestros resultados, Tansley et al., 2022, en un modelo de dolor neuropático, reportaron una reducción de los glucosaminoglucanos presentes en las RPNs de la lámina I del asta dorsal [348]. Además, demostraron que la eliminación de estos componentes moleculares es mediada por la microglía reactiva, la cual los fagocita de manera específica, preservando el componente proteico del agregano [348]. Sin embargo, se han reportado resultados diferentes en otras regiones de la vía del dolor. Por ejemplo, Mascio et al., 2022, mostraron que, en un modelo de dolor inflamatorio inducido por inyección intraplantar de ACF, se produce un aumento significativo en la expresión de glucosaminoglucanos en las RPNs que rodean a las neuronas GABAérgicas/parvalbúmina+ de la corteza somatosensorial primaria. Además, evidenciaron que la degradación enzimática de estos componentes revierte la respuesta al dolor característica de este modelo [349]. Estos hallazgos indican que las modificaciones son específicas de la región de la vía que se esté considerando.

Nuestros resultados evidencian un restablecimiento de la intensidad del marcado para agregano en los animales tratados con DCA, lo cual coincide con una disminución de la

reactividad glial. Los datos citados en la literatura nos permiten proponer que la modificación del fenotipo glial mediante la modulación metabólica con DCA sería responsable de restablecer la expresión de proteoglicanos.

Además de las modificaciones en la expresión de agregano, exploramos posibles alteraciones en la expresión de marcadores sinápticos. El estudio de la expresión de marcadores de sinapsis excitadoras e inhibitoras en el asta dorsal de la médula espinal de animales con dolor neuropático proporciona información valiosa sobre los mecanismos de neuroplasticidad implicados en el dolor crónico.

La microscopía de fluorescencia y la microscopía electrónica presentan ventajas y desventajas complementarias en el análisis de sinapsis individuales. La microscopía de fluorescencia permite la discriminación molecular a una alta velocidad y bajo costo, pero enfrenta desafíos en la discriminación precisa entre señales sinápticas y no sinápticas. En cambio, la microscopía electrónica sigue siendo el estándar de referencia para la identificación detallada de sinapsis, aunque es más lenta, costosa y presenta limitaciones en la discriminación molecular.

Para el análisis morfológico, la presencia del componente presináptico GAD67 se relaciona con la síntesis del neurotransmisor GABA y se utilizó como un indicativo del tono inhibitorio (GABAérgico) del sistema. Además, se definieron a las "sinapsis glutamatérgicas (excitatorias)" como una combinación específica, identificándose a partir del marcador presináptico VGLUT2 y el marcador postsináptico PSD95. Este enfoque ha sido utilizado previamente en la literatura para el análisis de diferentes tipos de sinapsis en áreas específicas del SNC [291], [350], [351]. Particularmente, se ha reportado que, mediante técnicas de superresolución y microscopía confocal, el aumento en la intensidad de fluorescencia de los botones postsinápticos inmunoreactivos para PSD95 se correlaciona con un incremento en el número de dominios enriquecidos de esta proteína conocidos como nanoclusters [291], [351]. De hecho, se han desarrollado métodos de procesamiento de imágenes para su identificación y cuantificación [352]. Asimismo, trabajos previos han proporcionado evidencias que respaldan la validez de las técnicas de microscopía de fluorescencia con marcadores sinápticos como método de estimación de la fuerza sináptica, ya que las variaciones en la intensidad y abundancia de estos marcadores se correlacionan con la probabilidad de liberación de neurotransmisores en los contactos sinápticos [139], [353], [354], [355].

El uso de GAD67 como marcador de componentes presinápticos GABAérgicos permite entender las modificaciones de las sinapsis inhibitoras en el dolor crónico. Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la inmunorreactividad para GAD67 restringida a la región dorsal de la médula espinal ipsilateral a la lesión, lo que sugiere una

reducción en la función de las sinapsis inhibitoras, lo cual podría contribuir a la facilitación de la transmisión nociceptiva y, por ende, a la exacerbación de la hipersensibilidad al dolor. Estas observaciones son coherentes con estudios en modelos de dolor neuropático que evidencian disminuciones en la expresión de GAD67 en el asta dorsal, lo que conduce a alteraciones en la función sináptica GABAérgica [139].

El estudio de los marcadores VGLUT2 y PSD95 de sinapsis glutamatérgicas registró un incremento en las médulas espinales ipsilaterales a la lesión. Este resultado refuerza la noción de que la transmisión sináptica glutamatérgica se intensifica en el contexto de dolor neuropático [67], [92]. El aumento en los niveles de expresión de estos marcadores, evaluado por inmunotransferencia, en el asta dorsal ipsilateral a la lesión, ha sido previamente reportado en la literatura en varios modelos de dolor [308], [310], [356], [357]. El tratamiento con DCA se asoció con una disminución en los niveles de expresión de VGLUT2, lo que apunta a un posible efecto modulador sobre las sinapsis excitatorias. Este resultado sugiere que la intervención metabólica no solo restaura la función inhibitoria, sino que también puede limitar la función excitatoria excesiva, un aspecto crucial en el manejo del dolor crónico.

La evaluación mediante inmunofluorescencia reveló detalles adicionales sobre la organización de las sinapsis. Aunque no se observaron diferencias en la densidad de las partículas positivas para VGLUT2 y PSD95 en la médula espinal entre los grupos, la intensidad de fluorescencia y el volumen de las mismas fueron significativamente mayores en los animales con dolor neuropático. Esto sugiere que, aunque la cantidad de sinapsis puede no estar alterada, las características morfológicas de las mismas están modificadas, lo que podría influir en la fuerza sináptica. La cuantificación de los contactos VGLUT2-PSD95 confirma que estamos cuantificando sinapsis glutamatérgicas en el contexto del dolor neuropático. El aumento en la densidad de estos contactos y de la intensidad de fluorescencia de las partículas involucradas, es una evidencia morfológica más clara del fenómeno de sensibilización central.

La modulación metabólica con DCA mostró ser efectiva para restablecer los niveles de expresión de los marcadores sinápticos, tanto GAD67 como los contactos VGLUT2/PSD95. Estas modificaciones se asociaron a una disminución en la hipersensibilidad al dolor, lo cual demuestra la plasticidad estructural del circuito del dolor está influenciada por la bioenergética mitocondrial, al menos a nivel del asta dorsal de la médula espinal.

Sería relevante corroborar mediante técnicas electrofisiológicas los hallazgos en la expresión de proteínas que indican modificaciones en la fuerza sináptica. No obstante, el hecho de que las modificaciones morfológicas coinciden con los resultados sobre la

hiperalgesia y alodinia respalda la hipótesis de que estamos abordando la sensibilización central.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el DCA puede actuar como un agente modulador en la plasticidad sináptica, restaurando tanto la expresión de marcadores de sinapsis inhibitoras y excitatorias, así como de componentes de la MEC. Esta acción del DCA destaca la importancia de una comprensión más profunda de la influencia de la bioenergética mitocondrial en los mecanismos subyacentes a la neuroplasticidad asociada con el dolor crónico.

¿EXISTE UNA RELACIÓN ENTRE LA REACTIVIDAD GLIAL Y LAS MODIFICACIONES SINÁPTICAS?

Nuestros resultados, junto con los aportes de la literatura, nos apoyan en sugerir que la reprogramación metabólica que ocurre durante la reactividad glial, especialmente en los astrocitos, es fundamental para las modificaciones estructurales que se producen durante la sensibilización central, siendo responsable en última instancia de las respuestas comportamentales asociadas con el dolor crónico.

Existen reportes de un importante número de mediadores liberados por astrocitos que pueden modular el funcionamiento sináptico en el asta dorsal relacionados con el dolor entre ellos glicina [358], trombospondina, lactato, factores neurotróficos [219]. Por ejemplo, se ha observado en estudios de microscopía confocal y de superresolución, que las sinapsis que exhiben mayor superficie de contacto con prolongaciones astrocitarias presentan mayor número de nanoclusters de PSD95 en sinapsis glutamatérgicas del hipocampo que las sinapsis con menor contacto con prolongaciones astrocitarias [291]. La reducción en la intensidad de fluorescencia encontrada tras el tratamiento con DCA sugiere una disminución en el número de nanoclusters de PSD95, lo que indicaría una menor fuerza sináptica. Este hallazgo podría explicar la disminución de la hiperalgesia y la alodinia observadas. De manera interesante eso se acompaña de una reducción en la reactividad para GFAP. Queda por definir si la retracción de los procesos astrocitarios luego del tratamiento con DCA participan de algún modo en la remodelación sináptica.

Por otra parte, los astrocitos y la microglía reactivos liberan citoquinas proinflamatorias, ATP, aminoácidos excitadores y NO, aumentando la transmisión sináptica excitadora y suprimiendo la inhibitoria en las neuronas de la lámina II de la médula espinal, desencadenando comportamientos de alodinia e hiperalgesia [128], [213]. En particular, los

astrocitos reactivos liberan IL-1 β y TNF- α , así como metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9, facilitando la sensibilización central en el dolor neuropático [359], [360], [361]. Ambas metaloproteinasas contribuyen a la modulación de IL-1 β y potencian la activación de los receptores NMDA [362], [363], [364]. Por otro lado, el aumento de la liberación de lactato por parte de los astrocitos reactivos podría contribuir a la disminución del pH extracelular. Estudios han demostrado que un pH extracelular ácido induce la expresión y activación de MMP-9, contribuyendo al establecimiento de nuevas sinapsis, promoviendo la sensibilización central en la médula espinal [365]. Además, las modificaciones en la MEC inducen una neuroinflamación autopropagada, en parte debido a la degradación de sus componentes, los cuales actúan como DAMPs. Esto activa aún más las respuestas al daño en las células no neuronales, amplificando la neuroinflamación, generando un círculo vicioso que perpetúa la patología [180].

Todo lo expuesto hasta aquí pone de manifiesto que la modulación metabólica revierte algunos de los aspectos de la neuroinflamación, un cambio patológico clave en el establecimiento de la cronicidad del dolor. Por lo tanto, ofrece múltiples blancos terapéuticos potenciales para modular la sintomatología del dolor crónico, para el cual existen pocas terapias efectivas.

CONCLUSIONES

- 1) La función respiratoria mitocondrial en la médula espinal regula la reactividad glial y altera la expresión de marcadores de plasticidad sináptica, cambios que se observan en modelos preclínicos de dolor crónico.
- 2) La recuperación de la función mitocondrial mediante un estímulo metabólico con DCA reduce la reactividad glial y restablece la expresión de marcadores sinápticos a niveles comparables a los de animales naïve, además de resultar en una disminución significativa de la hiperalgesia y la alodinia.
- 3) En este contexto, es fundamental considerar las implicaciones clínicas de nuestras observaciones, ya que sugieren que las estrategias orientadas a mejorar la función mitocondrial podrían constituir un enfoque terapéutico viable para aliviar los efectos del dolor crónico.
- 4) Futuros estudios deberían investigar en profundidad los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a estas interacciones, así como evaluar la eficacia de intervenciones similares en otros modelos de dolor y su posible traslación a la práctica clínica. La comprensión de cómo se entrelazan la función mitocondrial y la hipersensibilidad al dolor podría abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias efectivas en el tratamiento del dolor crónico.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, proponemos una serie de experimentos adicionales que complementen nuestros hallazgos y que puedan revelar nuevos mecanismos mediante los cuales la modulación metabólica con DCA reduce la hiperalgesia.

1) Estudiar la respirometría en células aisladas de médula espinal de animales adultos:

Los antecedentes de nuestro grupo en modelos murinos de ELA [269], [271], [338] y los resultados del presente estudio sugieren que la remodelación metabólica de los astrocitos reactivos es un factor clave en la cronificación del dolor. Sin embargo, nuestro trabajo no permite descartar la participación de la microglía en este contexto. Por lo tanto, un aspecto importante a profundizar es la identificación de la función respiratoria mitocondrial en tipos celulares específicos mediante respirometría en astrocitos y microglía aisladas de médula espinal de animales adultos con lesiones que inducen dolor crónico.

2) Realizar análisis comparativos con animales hembras:

La prevalencia del dolor crónico es mayor en mujeres [366], [367]; sin embargo, históricamente la mayoría de los estudios preclínicos se han llevado a cabo en machos [368]. No obstante, cada vez más investigaciones proporcionan evidencia del dimorfismo sexual en los mecanismos biológicos relacionados con el dolor crónico [369], [369], [370]. Utilizando modelos de dolor inflamatorio y neuropático, Chen et al., 2017, han demostrado que en la médula espinal la microglía desempeña un papel mas importante en machos, mientras que la señalización de los astrocitos es independiente del sexo [371]. Por lo tanto, consideramos fundamental la incorporación de hembras en el estudio para esclarecer el impacto de la bioenergética mitocondrial en los mecanismos de sensibilización central y la consecuente hipersensibilidad al dolor, así como para determinar si existen diferencias en comparación con los machos.

3) **Incluir marcadores adicionales para evaluar los cambios en la MEC:**

Para complementar los estudios de la remodelación de la MEC en animales con lesiones que inducen dolor crónico, es de nuestro interés estudiar los niveles de expresión de la aglutinina de glicina floribunda (Wisteria floribunda agglutinin, WFA), un marcador de glucosaminoglucanos de la MEC. En modelos de dolor neuropático, se ha observado que la expresión de WFA está reducida en el asta dorsal de la médula espinal, y que su degradación en animales naïve activa las neuronas de proyección de la lámina I, lo que incrementa la actividad de los circuitos nociceptivos y desencadena comportamientos de alodinia [348].

4) **Evaluar componentes producidos por astrocitos que podrían afectar la organización sináptica:**

Para evaluar la conexión entre la reactividad de los astrocitos y su modulación mediante el DCA en relación a la organización sináptica del asta dorsal de la médula espinal, se examinará el neurocan. Este proteoglicano de condroitín sulfato presente en la MEC [372], es secretado por los astrocitos e induce la sinaptogénesis inhibitoria en la corteza cerebral [355].

5) **Evaluar las modificaciones en sinapsis inhibitoras de manera más precisa:**

Consideramos fundamental estudiar las sinapsis inhibitoras mediante la aplicación del análisis morfológico de los marcadores y contactos sinápticos que previamente utilizamos en las sinapsis excitatorias. Por lo tanto, proponemos incorporar al estudio los marcadores VGAT y gefirina, que actúan como marcadores pre y postsinápticos, respectivamente. Estos marcadores son ampliamente utilizados en la literatura para identificar terminales inhibitoras [348], [355], [373].

6) **Corroborar que las modificaciones en la expresión de marcadores sinápticos se acompañan de modificaciones en la actividad sináptica:**

Es relevante complementar nuestros hallazgos con registros electrofisiológicos para comprender la excitabilidad del tejido, especialmente en las neuronas de proyección de la lámina I [348], [374], [375], [376] y en las interneuronas de las lámina II y III del asta dorsal de la médula espinal [90], [377], [378].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Sn *et al.*, "The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises," *Pain*, vol. 161, no. 9, Jan. 2020, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939.
- [2] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, Agud Aparicio, and A. Hernando Saudan, *Principios de neurociencia*, 1. ed. en español. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2001.
- [3] Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education, *Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. in The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011. Accessed: Nov. 21, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91497/>
- [4] B. Xu, G. Descalzi, H.-R. Ye, M. Zhuo, and Y.-W. Wang, "Translational investigation and treatment of neuropathic pain," *Mol. Pain*, vol. 8, p. 15, Mar. 2012, doi: 10.1186/1744-8069-8-15.
- [5] R.-D. Treede *et al.*, "A classification of chronic pain for ICD-11," *Pain*, vol. 156, no. 6, pp. 1003–1007, Jun. 2015, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000160.
- [6] E. Kosek *et al.*, "Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states?," *Pain*, vol. 157, no. 7, pp. 1382–1386, Jul. 2016, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000507.
- [7] B. L. Kidd and L. A. Urban, "Mechanisms of inflammatory pain," *Br. J. Anaesth.*, vol. 87, no. 1, pp. 3–11, Jul. 2001, doi: 10.1093/bja/87.1.3.
- [8] F. Xu *et al.*, "Complete Freund's adjuvant-induced acute inflammatory pain could be attenuated by triptolide via inhibiting spinal glia activation in rats," *J. Surg. Res.*, vol. 188, no. 1, pp. 174–182, May 2014, doi: 10.1016/j.jss.2013.11.1087.
- [9] S. P. Cohen, L. Vase, and W. M. Hooten, "Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 397, no. 10289, pp. 2082–2097, May 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(21)00393-7.
- [10] S. P. Cohen and J. Mao, "Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications," *BMJ*, vol. 348, p. f7656, Feb. 2014, doi: 10.1136/bmj.f7656.
- [11] M. Saavedra-Hernández, A. M. Castro-Sánchez, A. I. Cuesta-Vargas, J. A. Cleland, C. Fernández-de-las-Peñas, and M. Arroyo-Morales, "The contribution of previous episodes of pain, pain intensity, physical impairment, and pain-related fear to disability in patients with chronic mechanical neck pain," *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 91, no. 12, pp. 1070–1076, Dec. 2012, doi: 10.1097/PHM.0b013e31827449a5.
- [12] N. Spahr, D. Hodkinson, K. Jolly, S. Williams, M. Howard, and M. Thacker, "Distinguishing between nociceptive and neuropathic components in chronic low back pain using behavioural evaluation and sensory examination," *Musculoskelet. Sci. Pract.*, vol. 27, pp. 40–48, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.msksp.2016.12.006.
- [13] M.-A. Fitzcharles, S. P. Cohen, D. J. Clauw, G. Littlejohn, C. Usui, and W. Häuser, "Nociplastic pain: towards an understanding of prevalent pain conditions," *Lancet Lond.*

- Engl.*, vol. 397, no. 10289, pp. 2098–2110, May 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(21)00392-5.
- [14] C. B. Johannes, T. K. Le, X. Zhou, J. A. Johnston, and R. H. Dworkin, “The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey,” *J. Pain*, vol. 11, no. 11, pp. 1230–1239, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.jpain.2010.07.002.
 - [15] D. S. Goldberg and S. J. McGee, “Pain as a global public health priority,” *BMC Public Health*, vol. 11, p. 770, Oct. 2011, doi: 10.1186/1471-2458-11-770.
 - [16] F. M. Blyth and C. Huckel Schneider, “Global burden of pain and global pain policy-creating a purposeful body of evidence,” *Pain*, vol. 159 Suppl 1, pp. S43–S48, Sep. 2018, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001311.
 - [17] S. Kn *et al.*, “Prevalence of chronic pain in developing countries: systematic review and meta-analysis,” *Pain Rep.*, vol. 4, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1097/PR9.0000000000000779.
 - [18] J. B. S. Garcia *et al.*, “Prevalence of low back pain in Latin America: a systematic literature review,” *Pain Physician*, vol. 17, no. 5, pp. 379–391, 2014.
 - [19] de S. Jb, G. E, P. Dmn, de O. J. Jo, da F. Prb, and P. Ip, “Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey,” *Pain Res. Manag.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/4643830.
 - [20] A. Covarrubias-Gómez *et al.*, “First national summit meeting of delegates of the Mexican Association for the Study and Treatment of Pain,” *Rev. Mex. Anesthesiol.*, vol. 37, no. 2, pp. 142–147, 2014.
 - [21] B. N *et al.*, “Survey of chronic pain in Chile - prevalence and treatment, impact on mood, daily activities and quality of life,” *Scand. J. Pain*, vol. 18, no. 3, Jul. 2018, doi: 10.1515/sjpain-2018-0076.
 - [22] D. P. Aguiar, C. P. de Q. Souza, W. J. M. Barbosa, F. F. U. Santos-Júnior, and A. S. de Oliveira, “Prevalência de dor crônica no Brasil: revisão sistemática,” *BrJP*, vol. 4, pp. 257–267, Sep. 2021, doi: 10.5935/2595-0118.20210041.
 - [23] M. del C. Abreu *et al.*, “Una experiencia de trabajo interdisciplinario en dolor crónico. Resultados y desafíos,” *Rev. Médica Urug.*, vol. 35, no. 1, pp. 84–100, Mar. 2019, doi: 10.29193/rmu.35.5.
 - [24] D. C. Turk, H. D. Wilson, and A. Cahana, “Treatment of chronic non-cancer pain,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 377, no. 9784, pp. 2226–2235, Jun. 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60402-9.
 - [25] E. A. Salsitz, “Chronic Pain, Chronic Opioid Addiction: a Complex Nexus,” *J. Med. Toxicol. Off. J. Am. Coll. Med. Toxicol.*, vol. 12, no. 1, pp. 54–57, Mar. 2016, doi: 10.1007/s13181-015-0521-9.
 - [26] J. Vidal Fuentes, “Gabapentinoides: seguridad y uso en el punto de mira,” *Rev. Soc. Esp. Dolor*, vol. 26, no. 5, pp. 261–262, Oct. 2019, doi: 10.20986/resed.2019.3768/2019.
 - [27] B. L. Kieffer and C. J. Evans, “Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo,” *Neuropharmacology*, vol. 56 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. 205–212, 2009, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.033.
 - [28] S. H. Ahmedzai and J. Boland, “Opioids for chronic pain: molecular and genomic basis of actions and adverse effects,” *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, vol. 1, no. 2, pp.

- 117–125, Aug. 2007, doi: 10.1097/SPC.0b013e3282f04e0c.
- [29] B. A. Baldo, “Toxicities of opioid analgesics: respiratory depression, histamine release, hemodynamic changes, hypersensitivity, serotonin toxicity,” *Arch. Toxicol.*, vol. 95, no. 8, pp. 2627–2642, Aug. 2021, doi: 10.1007/s00204-021-03068-2.
- [30] S. Mercadante, E. Arcuri, and A. Santoni, “Opioid-Induced Tolerance and Hyperalgesia,” *CNS Drugs*, vol. 33, no. 10, pp. 943–955, Oct. 2019, doi: 10.1007/s40263-019-00660-0.
- [31] C. P. Taylor, T. Angelotti, and E. Fauman, “Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel $\alpha 2$ -delta ($\alpha 2$ -delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery,” *Epilepsy Res.*, vol. 73, no. 2, pp. 137–150, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.eplesyres.2006.09.008.
- [32] N. P. Coussens *et al.*, “The Opioid Crisis and the Future of Addiction and Pain Therapeutics,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 371, no. 2, pp. 396–408, Nov. 2019, doi: 10.1124/jpet.119.259408.
- [33] C. W. Goodman and A. S. Brett, “A Clinical Overview of Off-label Use of Gabapentinoid Drugs,” *JAMA Intern. Med.*, vol. 179, no. 5, pp. 695–701, May 2019, doi: 10.1001/jamainternmed.2019.0086.
- [34] N. E. Burma, H. Leduc-Pessah, C. Y. Fan, and T. Trang, “Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 95, no. 6, pp. 1242–1256, Jun. 2017, doi: 10.1002/jnr.23768.
- [35] National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. in The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Washington (DC): National Academies Press (US), 2009. Accessed: Dec. 11, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32658/>
- [36] C. W. Murray, F. Porreca, and A. Cowan, “Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain,” *J. Pharmacol. Methods*, vol. 20, no. 2, pp. 175–186, Sep. 1988, doi: 10.1016/0160-5402(88)90078-2.
- [37] L. L. Martin, L. L. Setescak, T. C. Spaulding, and G. C. Helsley, “Dibenz[b,e]oxepinalkanoic acids as nonsteroidal antiinflammatory agents. 4. Synthesis and evaluation of 4-(4,10-dihydro-10-oxothieno[3,2-c] [1]benzoxepin-8-yl)butanol and -butyric acid and related derivatives,” *J. Med. Chem.*, vol. 27, no. 3, pp. 372–376, Mar. 1984, doi: 10.1021/jm00369a023.
- [38] C. Stein, M. J. Millan, and A. Herz, “Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds,” *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 31, no. 2, pp. 445–451, Oct. 1988, doi: 10.1016/0091-3057(88)90372-3.
- [39] R.-X. Zhang and ke Ren, “Animal Models of Inflammatory Pain,” in *Neuromethods*, vol. 49, 2010, pp. 23–40. doi: 10.1007/978-1-60761-880-5_2.
- [40] V. Raghavendra, F. Y. Tanga, and J. A. DeLeo, “Complete Freund’s adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 20, no. 2, pp. 467–473, Jul. 2004, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03514.x.
- [41] C.-Y. Shi, X.-B. He, C. Zhao, and H.-J. Wang, “Luteoloside Exerts Analgesic Effect in a Complete Freund’s Adjuvant-Induced Inflammatory Model via Inhibiting Interleukin-1 β

- Expression and Macrophage/Microglia Activation," *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 1158, Jul. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01158.
- [42] J. V. Gómez-Barrios and V. Tortorici, "Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica," *Arch. Venez. Farmacol. Ter.*, vol. 28, no. 1, pp. 2–11, Jan. 2009.
- [43] G. J. Bennett and Y.-K. Xie, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man," *Pain*, vol. 33, no. 1, pp. 87–107, Apr. 1988, doi: 10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- [44] Z. Seltzer, R. Dubner, and Y. Shir, "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury," *Pain*, vol. 43, no. 2, pp. 205–218, Nov. 1990, doi: 10.1016/0304-3959(90)91074-S.
- [45] S. Ho Kim and J. Mo Chung, "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat," *Pain*, vol. 50, no. 3, pp. 355–363, Sep. 1992, doi: 10.1016/0304-3959(92)90041-9.
- [46] I. Decosterd and C. J. Woolf, "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain," *Pain*, vol. 87, no. 2, pp. 149–158, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1.
- [47] E. O. Gracheva and S. N. Bagriantsev, "Sensational channels," *Cell*, vol. 184, no. 26, pp. 6213–6216, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.11.034.
- [48] L. U. Sneddon, "Comparative Physiology of Nociception and Pain," *Physiol. Bethesda Md*, vol. 33, no. 1, pp. 63–73, Jan. 2018, doi: 10.1152/physiol.00022.2017.
- [49] S. A. Woller, K. A. Eddinger, M. Corr, and T. L. Yaksh, "An Overview of Pathways Encoding Nociception," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 35, no. Suppl 107, p. 40, Oct. 2017.
- [50] E. St John Smith, "Advances in understanding nociception and neuropathic pain," *J. Neurol.*, vol. 265, no. 2, pp. 231–238, Feb. 2018, doi: 10.1007/s00415-017-8641-6.
- [51] P. Bista and W. L. Imlach, "Pathological Mechanisms and Therapeutic Targets for Trigeminal Neuropathic Pain," *Med. Basel Switz.*, vol. 6, no. 3, p. 91, Aug. 2019, doi: 10.3390/medicines6030091.
- [52] A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius, "Cellular and Molecular Mechanisms of Pain," *Cell*, vol. 139, no. 2, pp. 267–284, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- [53] B. Rexed, "The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat," *J. Comp. Neurol.*, vol. 96, no. 3, pp. 414–495, Jun. 1952, doi: 10.1002/cne.900960303.
- [54] R. C. Spike, Z. Puskár, D. Andrew, and A. J. Todd, "A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 18, no. 9, pp. 2433–2448, 2003, doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x.
- [55] C. R. Anderson *et al.*, "The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas," in *The Spinal Cord*, C. Watson, G. Paxinos, and G. Kayalioglu, Eds., San Diego: Academic Press, 2009, p. v. doi: 10.1016/B978-0-12-374247-6.50001-8.
- [56] C. Watson, G. Paxinos, and G. Kayalioglu, Eds., "Copyright," in *The Spinal Cord*, San Diego: Academic Press, 2009, p. vi. doi: 10.1016/B978-0-12-374247-6.50002-X.
- [57] G. Missig *et al.*, "Parabrachial PACAP activation of amygdala endosomal ERK signaling regulates the emotional component of pain," *Biol. Psychiatry*, vol. 81, no. 8, p. 671, Aug.

2016, doi: 10.1016/j.biopsycho.2016.08.025.

- [58] "Wall & Melzack's Textbook of Pain - 6th Edition." Accessed: Dec. 02, 2023. [Online]. Available:
<https://shop.elsevier.com/books/wall-and-melzacks-textbook-of-pain/mcmahon/978-0-7020-4059-7>
- [59] W. D. Snider and S. B. McMahon, "Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors," *Neuron*, vol. 20, no. 4, pp. 629–632, Apr. 1998, doi: 10.1016/s0896-6273(00)81003-x.
- [60] J. M. Braz, M. A. Nassar, J. N. Wood, and A. I. Basbaum, "Parallel 'pain' pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor," *Neuron*, vol. 47, no. 6, pp. 787–793, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.015.
- [61] A. V. Apkarian, M. C. Bushnell, R.-D. Treede, and J.-K. Zubieta, "Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease," *Eur. J. Pain Lond. Engl.*, vol. 9, no. 4, pp. 463–484, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.ejpain.2004.11.001.
- [62] I. S. Ramsey, M. Delling, and D. E. Clapham, "An introduction to TRP channels," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 68, pp. 619–647, 2006, doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431.
- [63] B. Frias and A. Merighi, "Capsaicin, Nociception and Pain," *Mol. Basel Switz.*, vol. 21, no. 6, p. 797, Jun. 2016, doi: 10.3390/molecules21060797.
- [64] "Nociception - PubMed." Accessed: Dec. 06, 2023. [Online]. Available:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28222285/>
- [65] W. D. Tracey, "Nociception," *Curr. Biol. CB*, vol. 27, no. 4, pp. R129–R133, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.cub.2017.01.037.
- [66] S. A. Armstrong and M. J. Herr, "Physiology, Nociception," in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Accessed: Dec. 06, 2023. [Online]. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551562/>
- [67] R.-R. Ji, A. Nackley, Y. Huh, N. Terrando, and W. Maixner, "Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain," *Anesthesiology*, vol. 129, no. 2, pp. 343–366, Aug. 2018, doi: 10.1097/ALN.0000000000002130.
- [68] S. B. McMahon and N. G. Jones, "Plasticity of pain signaling: role of neurotrophic factors exemplified by acid-induced pain," *J. Neurobiol.*, vol. 61, no. 1, pp. 72–87, Oct. 2004, doi: 10.1002/neu.20093.
- [69] C. Luo, T. Kuner, and R. Kuner, "Synaptic plasticity in pathological pain," *Trends Neurosci.*, vol. 37, no. 6, pp. 343–355, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.tins.2014.04.002.
- [70] M. S. Gold and G. F. Gebhart, "Nociceptor sensitization in pain pathogenesis," *Nat. Med.*, vol. 16, no. 11, pp. 1248–1257, Nov. 2010, doi: 10.1038/nm.2235.
- [71] C. J. Woolf and Q. Ma, "Nociceptors--noxious stimulus detectors," *Neuron*, vol. 55, no. 3, pp. 353–364, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.016.
- [72] F. A. Pinho-Ribeiro, W. A. Verri, and I. M. Chiu, "Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation," *Trends Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 5–19, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.it.2016.10.001.
- [73] A. M. Binshtok *et al.*, "Nociceptors are interleukin-1beta sensors," *J. Neurosci. Off. J.*

- Soc. Neurosci.*, vol. 28, no. 52, pp. 14062–14073, Dec. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008.
- [74] M. Ebbinghaus *et al.*, “The role of interleukin-1 β in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 12, pp. 3897–3907, Dec. 2012, doi: 10.1002/art.34675.
- [75] S. Gudes, O. Barkai, Y. Caspi, B. Katz, S. Lev, and A. M. Binshtok, “The role of slow and persistent TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor- α -mediated increase in nociceptors excitability,” *J. Neurophysiol.*, vol. 113, no. 2, pp. 601–619, Jan. 2015, doi: 10.1152/jn.00652.2014.
- [76] L. S. Sorkin and C. M. Doom, “Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat,” *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS*, vol. 5, no. 2, pp. 96–100, Jun. 2000, doi: 10.1046/j.1529-8027.2000.00012.x.
- [77] C. E. Constantin *et al.*, “Endogenous Tumor Necrosis Factor α (TNF α) Requires TNF Receptor Type 2 to Generate Heat Hyperalgesia in a Mouse Cancer Model,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 19, pp. 5072–5081, May 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4476-07.2008.
- [78] C. J. Woolf, A. Allchorne, B. Safieh-Garabedian, and S. Poole, “Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 121, no. 3, pp. 417–424, Jun. 1997, doi: 10.1038/sj.bjp.0701148.
- [79] M. Schäfers, C. I. Svensson, C. Sommer, and L. S. Sorkin, “Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 23, no. 7, pp. 2517–2521, Apr. 2003, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02517.2003.
- [80] A. M. Binshtok *et al.*, “Nociceptors Are Interleukin-1 β Sensors,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 52, pp. 14062–14073, Dec. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008.
- [81] C. J. Woolf, “Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity,” *Nature*, vol. 306, no. 5944, pp. 686–688, Dec. 1983, doi: 10.1038/306686a0.
- [82] F. Moehring, P. Halder, R. P. Seal, and C. L. Stucky, “Uncovering the Cells and Circuits of Touch in Normal and Pathological Settings,” *Neuron*, vol. 100, no. 2, pp. 349–360, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.019.
- [83] A. Latremoliere and C. J. Woolf, “Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity,” *J. Pain*, vol. 10, no. 9, pp. 895–926, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- [84] J. H. Kelleher, D. Tewari, and S. B. McMahon, “Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 97, no. Pt B, pp. 127–138, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.nbd.2016.03.025.
- [85] R.-R. Ji, T. Kohno, K. A. Moore, and C. J. Woolf, “Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?,” *Trends Neurosci.*, vol. 26, no. 12, pp. 696–705, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.tins.2003.09.017.
- [86] C. J. Woolf, “Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain,” *Pain*, vol. 152, no. 3 Suppl, pp. S2–S15, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.pain.2010.09.030.
- [87] N. B. Finnerup, R. Kuner, and T. S. Jensen, “Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment,” *Physiol. Rev.*, vol. 101, no. 1, pp. 259–301, Jan. 2021, doi: 10.1152/physrev.00045.2019.

- [88] A. J. Todd *et al.*, "The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 17, no. 1, pp. 13–27, Jan. 2003, doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02406.x.
- [89] D. J. Maxwell, M. D. Belle, O. Cheunsuang, A. Stewart, and R. Morris, "Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn," *J. Physiol.*, vol. 584, no. Pt 2, pp. 521–533, Oct. 2007, doi: 10.1113/jphysiol.2007.140996.
- [90] T. Yasaka, S. Y. X. Tiong, D. I. Hughes, J. S. Riddell, and A. J. Todd, "Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach," *Pain*, vol. 151, no. 2, pp. 475–488, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.pain.2010.08.008.
- [91] S. F. A. Santos, S. Rebelo, V. A. Derkach, and B. V. Safronov, "Excitatory interneurons dominate sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat," *J. Physiol.*, vol. 581, no. Pt 1, pp. 241–254, May 2007, doi: 10.1113/jphysiol.2006.126912.
- [92] L. Wang, S.-R. Chen, H. Ma, H. Chen, W. N. Hittelman, and H.-L. Pan, "Regulating nociceptive transmission by VGluT2-expressing spinal dorsal horn neurons," *J. Neurochem.*, vol. 147, no. 4, pp. 526–540, Nov. 2018, doi: 10.1111/jnc.14588.
- [93] S.-R. Chen, H.-Y. Zhou, H. S. Byun, H. Chen, and H.-L. Pan, "Casein kinase II regulates N-methyl-D-aspartate receptor activity in spinal cords and pain hypersensitivity induced by nerve injury," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 350, no. 2, pp. 301–312, Aug. 2014, doi: 10.1124/jpet.114.215855.
- [94] L. Li *et al.*, "Chloride Homeostasis Critically Regulates Synaptic NMDA Receptor Activity in Neuropathic Pain," *Cell Rep.*, vol. 15, no. 7, pp. 1376–1383, May 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.039.
- [95] K. Ren, J. L. K. Hylden, G. M. Williams, M. A. Ruda, and R. Dubner, "The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation," *Pain*, vol. 50, no. 3, pp. 331–344, Sep. 1992, doi: 10.1016/0304-3959(92)90039-E.
- [96] R. Dubner and M. A. Ruda, "Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation," *Trends Neurosci.*, vol. 15, no. 3, pp. 96–103, Mar. 1992, doi: 10.1016/0166-2236(92)90019-5.
- [97] X. J. Liu *et al.*, "Treatment of Inflammatory and Neuropathic Pain by Uncoupling Src from the NMDA Receptor Complex," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 12, pp. 1325–1332, Dec. 2008, doi: 10.1038/nm.1883.
- [98] R. R. Ji, H. Baba, G. J. Brenner, and C. J. Woolf, "Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity," *Nat. Neurosci.*, vol. 2, no. 12, pp. 1114–1119, Dec. 1999, doi: 10.1038/16040.
- [99] F. Karim, C. C. Wang, and R. W. Gereau, "Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 21, no. 11, pp. 3771–3779, Jun. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-11-03771.2001.
- [100] Y.-J. Gao and R.-R. Ji, "c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury?," *Open Pain J.*, vol. 2, pp. 11–17, Jan. 2009, doi: 10.2174/1876386300902010011.

- [101] Z.-Z. Xu *et al.*, “Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 5, pp. 592–597, 1p following 597, May 2010, doi: 10.1038/nm.2123.
- [102] Y.-J. Gao *et al.*, “JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 29, no. 13, pp. 4096–4108, Apr. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009.
- [103] H.-J. Hu, K. S. Glauner, and R. W. Gereau, “ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents,” *J. Neurophysiol.*, vol. 90, no. 3, pp. 1671–1679, Sep. 2003, doi: 10.1152/jn.00340.2003.
- [104] H.-J. Hu *et al.*, “The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity,” *Neuron*, vol. 50, no. 1, pp. 89–100, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.010.
- [105] Y. X. Tao, Y. Z. Huang, L. Mei, and R. A. Johns, “Expression of PSD-95/SAP90 is critical for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated thermal hyperalgesia in the spinal cord,” *Neuroscience*, vol. 98, no. 2, pp. 201–206, 2000, doi: 10.1016/s0306-4522(00)00193-7.
- [106] H. C. Kornau, L. T. Schenker, M. B. Kennedy, and P. H. Seeburg, “Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95,” *Science*, vol. 269, no. 5231, pp. 1737–1740, Sep. 1995, doi: 10.1126/science.7569905.
- [107] K. S. Christopherson, B. J. Hillier, W. A. Lim, and D. S. Brecht, “PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 39, pp. 27467–27473, Sep. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.39.27467.
- [108] H. Tochio, Q. Zhang, P. Mandal, M. Li, and M. Zhang, “Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, no. 5, pp. 417–421, May 1999, doi: 10.1038/8216.
- [109] D. Brecht, “Solution structure and backbone dynamics of the second PDZ domain of postsynaptic density-95 1 1 Edited by P. E. Wright,” *J Mol Biol*, Jan. 2000, Accessed: Dec. 11, 2023. [Online]. Available: https://www.academia.edu/63217011/Solution_structure_and_backbone_dynamics_of_the_second_PDZ_domain_of_postsynaptic_density_95_1_1_Edited_by_P_E_Wright
- [110] H. Tochio, Y. K. Mok, Q. Zhang, H. M. Kan, D. S. Brecht, and M. Zhang, “Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain,” *J. Mol. Biol.*, vol. 303, no. 3, pp. 359–370, Oct. 2000, doi: 10.1006/jmbi.2000.4148.
- [111] R. Sattler, Z. Xiong, W. Y. Lu, M. Hafner, J. F. MacDonald, and M. Tymianski, “Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein,” *Science*, vol. 284, no. 5421, pp. 1845–1848, Jun. 1999, doi: 10.1126/science.284.5421.1845.
- [112] R.-R. Ji and G. Strichartz, “Cell signaling and the genesis of neuropathic pain,” *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.*, vol. 2004, no. 252, p. reE14, Sep. 2004, doi: 10.1126/stke.2522004re14.
- [113] M. M. Aarts and M. Tymianski, “Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, no. 6, pp. 877–886, Sep. 2003, doi: 10.1016/s0006-2952(03)00297-1.

- [114] S. K. Florio *et al.*, "Disruption of nNOS-PSD95 protein-protein interaction inhibits acute thermal hyperalgesia and chronic mechanical allodynia in rodents," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 158, no. 2, pp. 494–506, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00300.x.
- [115] D. Meyer, T. Bonhoeffer, and V. Scheuss, "Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity," *Neuron*, vol. 82, no. 2, pp. 430–443, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.031.
- [116] P. Zhang and J. E. Lisman, "Activity-dependent regulation of synaptic strength by PSD-95 in CA1 neurons," *J. Neurophysiol.*, vol. 107, no. 4, pp. 1058–1066, Feb. 2012, doi: 10.1152/jn.00526.2011.
- [117] J.-C. Béïque and R. Andrade, "PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex," *J. Physiol.*, vol. 546, no. Pt 3, pp. 859–867, Feb. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2002.031369.
- [118] I. Ehrlich and R. Malinow, "Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, no. 4, pp. 916–927, Jan. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4733-03.2004.
- [119] I. Ehrlich, M. Klein, S. Rumpel, and R. Malinow, "PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 10, pp. 4176–4181, Mar. 2007, doi: 10.1073/pnas.0609307104.
- [120] F. Tao, Y.-X. Tao, P. Mao, and R. A. Johns, "Role of postsynaptic density protein-95 in the maintenance of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain in rats," *Neuroscience*, vol. 117, no. 3, pp. 731–739, 2003, doi: 10.1016/s0306-4522(02)00801-1.
- [121] M. Migaud *et al.*, "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein," *Nature*, vol. 396, no. 6710, pp. 433–439, Dec. 1998, doi: 10.1038/24790.
- [122] E. M. Garry *et al.*, "Neuropathic sensitization of behavioral reflexes and spinal NMDA receptor/CaM kinase II interactions are disrupted in PSD-95 mutant mice," *Curr. Biol. CB*, vol. 13, no. 4, pp. 321–328, Feb. 2003, doi: 10.1016/s0960-9822(03)00084-8.
- [123] R. D'Mello, F. Marchand, S. Pezet, S. B. McMahon, and A. H. Dickenson, "Perturbing PSD-95 interactions with NR2B-subtype receptors attenuates spinal nociceptive plasticity and neuropathic pain," *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 19, no. 10, pp. 1780–1792, Oct. 2011, doi: 10.1038/mt.2011.42.
- [124] F. Tao, Q. Su, and R. A. Johns, "Cell-permeable peptide Tat-PSD-95 PDZ2 inhibits chronic inflammatory pain behaviors in mice," *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 16, no. 11, pp. 1776–1782, Nov. 2008, doi: 10.1038/mt.2008.192.
- [125] Y.-B. Zhu *et al.*, "Activation of CaMKII and GluR1 by the PSD-95-GluN2B Coupling-Dependent Phosphorylation of GluN2B in the Spinal Cord in a Rat Model of Type-2 Diabetic Neuropathic Pain," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 79, no. 7, pp. 800–808, Jul. 2020, doi: 10.1093/jnen/nlaa035.
- [126] F. Xu *et al.*, "Perturbing NR2B-PSD-95 interaction relieves neuropathic pain by inactivating CaMKII-CREB signaling," *Neuroreport*, vol. 28, no. 13, pp. 856–863, Sep. 2017, doi: 10.1097/WNR.0000000000000849.
- [127] W.-H. Lee *et al.*, "Small molecule inhibitors of PSD95-nNOS protein-protein

- interactions as novel analgesics," *Neuropharmacology*, vol. 97, pp. 464–475, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.038.
- [128] Y. S. Gwak and C. E. Hulsebosch, "GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury," *Neuropharmacology*, vol. 60, no. 5, pp. 799–808, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.030.
- [129] W. D. Willis and K. N. Westlund, "Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain," *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.*, vol. 14, no. 1, pp. 2–31, Jan. 1997, doi: 10.1097/00004691-199701000-00002.
- [130] A. J. Todd and A. C. Sullivan, "Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat," *J. Comp. Neurol.*, vol. 296, no. 3, pp. 496–505, Jun. 1990, doi: 10.1002/cne.902960312.
- [131] E. Foster *et al.*, "Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch," *Neuron*, vol. 85, no. 6, pp. 1289–1304, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.028.
- [132] A. J. Todd, "Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2010, doi: 10.1038/nrn2947.
- [133] Q. Yang *et al.*, "Persistent pain after spinal cord injury is maintained by primary afferent activity," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 34, no. 32, pp. 10765–10769, Aug. 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5316-13.2014.
- [134] D. I. Hughes and A. J. Todd, "Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord," *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, vol. 17, no. 3, pp. 874–885, Jul. 2020, doi: 10.1007/s13311-020-00936-0.
- [135] D. Guo and J. Hu, "Spinal presynaptic inhibition in pain control," *Neuroscience*, vol. 283, pp. 95–106, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.032.
- [136] M. A. Gradwell, R. J. Callister, and B. A. Graham, "Reviewing the case for compromised spinal inhibition in neuropathic pain," *J. Neural Transm.*, vol. 127, no. 4, pp. 481–503, Apr. 2020, doi: 10.1007/s00702-019-02090-0.
- [137] J. M. Bráz *et al.*, "Forebrain GABAergic Neuron Precursors Integrate into Adult Spinal Cord and Reduce Injury-Induced Neuropathic Pain," *Neuron*, vol. 74, no. 4, pp. 663–675, May 2012, doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.033.
- [138] L.-E. Lorenzo *et al.*, "Gephyrin Clusters Are Absent from Small Diameter Primary Afferent Terminals Despite the Presence of GABAA Receptors," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 24, pp. 8300–8317, Jun. 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0159-14.2014.
- [139] Z.-Z. Huang *et al.*, "mir-500-Mediated GAD67 Downregulation Contributes to Neuropathic Pain," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 36, no. 23, pp. 6321–6331, Jun. 2016, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0646-16.2016.
- [140] J. G. Meisner, A. D. Marsh, and D. R. Marsh, "Loss of GABAergic interneurons in laminae I-III of the spinal cord dorsal horn contributes to reduced GABAergic tone and neuropathic pain after spinal cord injury," *J. Neurotrauma*, vol. 27, no. 4, pp. 729–737, Apr. 2010, doi: 10.1089/neu.2009.1166.
- [141] J. Liu *et al.*, "Peripherally delivered glutamic acid decarboxylase gene therapy for spinal cord injury pain," *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 57–66, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.ymthe.2004.04.017.

- [142] M. L. Jensen, D. B. Timmermann, T. H. Johansen, A. Schousboe, T. Varming, and P. K. Ahring, "The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 44, pp. 41438–41447, Nov. 2002, doi: 10.1074/jbc.M205645200.
- [143] W. Sieghart and G. Sperk, "Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 2, no. 8, pp. 795–816, Aug. 2002, doi: 10.2174/1568026023393507.
- [144] K. J. Charles, A. R. Calver, S. Jourdain, and M. N. Pangalos, "Distribution of a GABAB-like receptor protein in the rat central nervous system," *Brain Res.*, vol. 989, no. 2, pp. 135–146, Nov. 2003, doi: 10.1016/s0006-8993(03)03163-9.
- [145] K. J. Charles, J. Deuchars, C. H. Davies, and M. N. Pangalos, "GABA B receptor subunit expression in glia," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 24, no. 1, pp. 214–223, Sep. 2003, doi: 10.1016/s1044-7431(03)00162-3.
- [146] A. Schousboe, A. Sarup, O. M. Larsson, and H. S. White, "GABA transporters as drug targets for modulation of GABAergic activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 68, no. 8, pp. 1557–1563, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2004.06.041.
- [147] T. Pizzorusso, P. Medini, N. Berardi, S. Chierzi, J. W. Fawcett, and L. Maffei, "Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex," *Science*, vol. 298, no. 5596, pp. 1248–1251, Nov. 2002, doi: 10.1126/science.1072699.
- [148] R. Frischknecht, M. Heine, D. Perrais, C. I. Seidenbecher, D. Choquet, and E. D. Gundelfinger, "Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity," *Nat. Neurosci.*, vol. 12, no. 7, pp. 897–904, Jul. 2009, doi: 10.1038/nn.2338.
- [149] E. Favuzzi *et al.*, "Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican," *Neuron*, vol. 95, no. 3, pp. 639–655.e10, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.028.
- [150] C. Lander, P. Kind, M. Maleski, and S. Hockfield, "A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 17, no. 6, pp. 1928–1939, Mar. 1997, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-06-01928.1997.
- [151] P. C. Kind *et al.*, "The Development and Activity-Dependent Expression of Aggrecan in the Cat Visual Cortex," *Cereb. Cortex N. Y. NY*, vol. 23, no. 2, pp. 349–360, Feb. 2013, doi: 10.1093/cercor/bhs015.
- [152] E. Syková, "The Extracellular Space in the CNS: Its Regulation, Volume and Geometry in Normal and Pathological Neuronal Function," *The Neuroscientist*, vol. 3, no. 1, pp. 28–41, Jan. 1997, doi: 10.1177/107385849700300113.
- [153] C. Nicholson and E. Syková, "Extracellular space structure revealed by diffusion analysis," *Trends Neurosci.*, vol. 21, no. 5, pp. 207–215, May 1998, doi: 10.1016/s0166-2236(98)01261-2.
- [154] I. Song and A. Dityatev, "Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons," *Brain Res. Bull.*, vol. 136, pp. 101–108, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.003.
- [155] C. S. Barros, S. J. Franco, and U. Müller, "Extracellular matrix: functions in the nervous system," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, p. a005108, Jan. 2011,

doi: 10.1101/cshperspect.a005108.

- [156] C. Mr and B. I, "Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system," *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 19, no. 1, Jan. 1994, doi: 10.1016/0165-0173(94)90006-x.
- [157] M. R. Celio and R. Chiquet-Ehrismann, "'Perineuronal nets' around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin," *Neurosci. Lett.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 137–140, Nov. 1993, doi: 10.1016/0304-3940(93)90579-a.
- [158] K. A. Giamanco and R. T. Matthews, "Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix," *Neuroscience*, vol. 218, pp. 367–384, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.055.
- [159] J. W. Fawcett, T. Ohashi, and T. Pizzorusso, "The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 20, no. 8, pp. 451–465, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41583-019-0196-3.
- [160] L. W. Lau, R. Cua, M. B. Keough, S. Haylock-Jacobs, and V. W. Yong, "Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, no. 10, pp. 722–729, Oct. 2013, doi: 10.1038/nrn3550.
- [161] S. S. Deepa *et al.*, "Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 26, pp. 17789–17800, Jun. 2006, doi: 10.1074/jbc.M600544200.
- [162] D. Carulli and J. Verhaagen, "An Extracellular Perspective on CNS Maturation: Perineuronal Nets and the Control of Plasticity," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 5, p. 2434, Feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22052434.
- [163] D. Lendvai *et al.*, "Perisynaptic aggrecan-based extracellular matrix coats in the human lateral geniculate body devoid of perineuronal nets," *J. Neurosci. Res.*, vol. 90, no. 2, pp. 376–387, Feb. 2012, doi: 10.1002/jnr.22761.
- [164] C. Jäger *et al.*, "Perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in the human spinal cord," *Neuroscience*, vol. 238, pp. 168–184, May 2013, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.014.
- [165] "Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit - PubMed." Accessed: Dec. 12, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18055126/>
- [166] A. C. Reichelt, D. J. Hare, T. J. Bussey, and L. M. Saksida, "Perineuronal Nets: Plasticity, Protection, and Therapeutic Potential," *Trends Neurosci.*, vol. 42, no. 7, pp. 458–470, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.tins.2019.04.003.
- [167] J. Rohrbough, E. Rushton, I. I. I. Elvin Woodruff, T. Fergestad, K. Vigneswaran, and K. Broadie, "Presynaptic establishment of the synaptic cleft extracellular matrix is required for post-synaptic differentiation," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 20, p. 2607, Oct. 2007, doi: 10.1101/gad.1574107.
- [168] M. Blosa *et al.*, "Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body--implications for physiological functions," *Neuroscience*, vol. 228, pp. 215–234, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.003.
- [169] B. C. Hains and S. G. Waxman, "Activated Microglia Contribute to the Maintenance of Chronic Pain after Spinal Cord Injury," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 16, pp. 4308–4317,

Apr. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006.

- [170] T. M. Dankovich and S. O. Rizzoli, "The Synaptic Extracellular Matrix: Long-Lived, Stable, and Still Remarkably Dynamic," *Front. Synaptic Neurosci.*, vol. 14, 2022, Accessed: Dec. 13, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2022.854956>
- [171] A. Dityatev and M. Schachner, "Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 4, no. 6, pp. 456–468, Jun. 2003, doi: 10.1038/nrn1115.
- [172] A. Dityatev, G. Brückner, G. Dityateva, J. Grosche, R. Kleene, and M. Schachner, "Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets," *Dev. Neurobiol.*, vol. 67, no. 5, pp. 570–588, Apr. 2007, doi: 10.1002/dneu.20361.
- [173] T. S. Balmer, "Perineuronal Nets Enhance the Excitability of Fast-Spiking Neurons," *eNeuro*, vol. 3, no. 4, p. ENEURO.0112-16.2016, Jul. 2016, doi: 10.1523/ENEURO.0112-16.2016.
- [174] N. Uriarte, M. Ferreño, D. Méndez, and J. Nogueira, "Reorganization of perineuronal nets in the medial Preoptic Area during the reproductive cycle in female rats," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 5479, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62163-z.
- [175] D. Rowlands *et al.*, "Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 38, no. 47, pp. 10102–10113, Nov. 2018, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018.
- [176] K. K. Lensjø, M. E. Lepperød, G. Dick, T. Hafting, and M. Fyhn, "Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 37, no. 5, pp. 1269–1283, Feb. 2017, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016.
- [177] E. M. Boggio *et al.*, "Inhibition of Semaphorin3A Promotes Ocular Dominance Plasticity in the Adult Rat Visual Cortex," *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 9, pp. 5987–5997, Sep. 2019, doi: 10.1007/s12035-019-1499-0.
- [178] C. Orlando, J. Ster, U. Gerber, J. W. Fawcett, and O. Raineteau, "Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 32, no. 50, pp. 18009–18017, 18017a, Dec. 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2406-12.2012.
- [179] L. de Vivo *et al.*, "Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1484, 2013, doi: 10.1038/ncomms2491.
- [180] A. D. Gaudet and P. G. Popovich, "Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord," *Exp. Neurol.*, vol. 0, pp. 24–34, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.expneurol.2013.11.020.
- [181] X. Fan and Y. Agid, "At the Origin of the History of Glia," *Neuroscience*, vol. 385, pp. 255–271, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.050.
- [182] S. Jäkel and L. Dimou, "Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, p. 24, 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00024.
- [183] A. Verkhratsky, "Physiology of neuronal–glial networking," *Neurochem. Int.*, vol. 57,

- no. 4, pp. 332–343, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.neuint.2010.02.002.
- [184] N. J. Allen and D. A. Lyons, “Glia as architects of central nervous system formation and function,” *Science*, vol. 362, no. 6411, pp. 181–185, Oct. 2018, doi: 10.1126/science.aat0473.
 - [185] A. Kriegstein and A. Alvarez-Buylla, “The glial nature of embryonic and adult neural stem cells,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 32, pp. 149–184, 2009, doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
 - [186] M. S. Thion, F. Ginhoux, and S. Garel, “Microglia and early brain development: An intimate journey,” *Science*, vol. 362, no. 6411, pp. 185–189, Oct. 2018, doi: 10.1126/science.aat0474.
 - [187] V. Parpura and A. Verkhratsky, “Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept,” *ASN Neuro*, vol. 4, no. 4, pp. 201–205, May 2012, doi: 10.1042/AN20120019.
 - [188] A. Verkhratsky and M. Nedergaard, “Physiology of Astroglia,” *Physiol. Rev.*, vol. 98, no. 1, pp. 239–389, Jan. 2018, doi: 10.1152/physrev.00042.2016.
 - [189] M. Augusto-Oliveira *et al.*, “Astroglia-specific contributions to the regulation of synapses, cognition and behaviour,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 118, pp. 331–357, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.07.039.
 - [190] P. G. Haydon, “GLIA: listening and talking to the synapse,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 2, no. 3, pp. 185–193, Mar. 2001, doi: 10.1038/35058528.
 - [191] C. Murphy-Royal, J. Dupuis, L. Groc, and S. H. R. Oliet, “Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 95, no. 11, pp. 2140–2151, Nov. 2017, doi: 10.1002/jnr.24029.
 - [192] H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, “Physiology of microglia,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 461–553, Apr. 2011, doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
 - [193] U. B. Eyo and L.-J. Wu, “Microglia: Lifelong patrolling immune cells of the brain,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 179, p. 101614, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.04.003.
 - [194] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen, “Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo,” *Science*, vol. 308, no. 5726, pp. 1314–1318, May 2005, doi: 10.1126/science.1110647.
 - [195] J. C. Cronk and J. Kipnis, “Microglia - the brain’s busy bees,” *F1000prime Rep.*, vol. 5, p. 53, Dec. 2013, doi: 10.12703/P5-53.
 - [196] J. C. Savage, M. Carrier, and M.-È. Tremblay, “Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease,” *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 2034, pp. 13–26, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9658-2_2.
 - [197] L. P. Rowland and N. A. Shneider, “Amyotrophic lateral sclerosis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 22, pp. 1688–1700, May 2001, doi: 10.1056/NEJM200105313442207.
 - [198] S. B. McMahon and M. Malcangio, “Current challenges in glia-pain biology,” *Neuron*, vol. 64, no. 1, pp. 46–54, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.033.
 - [199] R.-R. Ji, T. Berta, and M. Nedergaard, “Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?,”

- Pain*, vol. 154, no. 0 1, pp. S10–S28, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022.
- [200] A. Verkhratsky, R. Zorec, and V. Parpura, “Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain,” *Brain Pathol.*, vol. 27, no. 5, pp. 629–644, Aug. 2017, doi: 10.1111/bpa.12537.
- [201] S. A. Liddel and B. A. Barres, “Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential,” *Immunity*, vol. 46, no. 6, pp. 957–967, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.
- [202] Q.-Q. Yang and J.-W. Zhou, “Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells,” *Glia*, vol. 67, no. 6, pp. 1017–1035, Jun. 2019, doi: 10.1002/glia.23571.
- [203] M. V. Sofroniew, “Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity,” *Trends Immunol.*, vol. 41, no. 9, pp. 758–770, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.it.2020.07.004.
- [204] J. L. Zamanian *et al.*, “Genomic Analysis of Reactive Astroglia,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 18, pp. 6391–6410, May 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
- [205] C. Escartin *et al.*, “Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions,” *Nat. Neurosci.*, vol. 24, no. 3, pp. 312–325, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
- [206] A. A. Atta, W. W. Ibrahim, A. F. Mohamed, and N. F. Abdelkader, “Microglia polarization in nociceptive pain: mechanisms and perspectives,” *Inflammopharmacology*, vol. 31, no. 3, pp. 1053–1067, Jun. 2023, doi: 10.1007/s10787-023-01216-x.
- [207] W. Y. Tam and C. H. E. Ma, “Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes,” *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 7279, Dec. 2014, doi: 10.1038/srep07279.
- [208] R. C. Paolicelli *et al.*, “Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads,” *Neuron*, vol. 110, no. 21, pp. 3458–3483, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
- [209] S. Echeverry, X. Q. Shi, and J. Zhang, “Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain,” *Pain*, vol. 135, no. 1–2, pp. 37–47, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.pain.2007.05.002.
- [210] S. Choi, K. Kim, M. Kwon, S. J. Bai, M. Cha, and B. H. Lee, “Modulation of Neuropathic Pain by Glial Regulation in the Insular Cortex of Rats,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 15, p. 815945, 2022, doi: 10.3389/fnmol.2022.815945.
- [211] L. Del Valle, R. J. Schwartzman, and G. Alexander, “Spinal cord histopathological alterations in a patient with longstanding complex regional pain syndrome,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 23, no. 1, pp. 85–91, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.bbi.2008.08.004.
- [212] M. L. Loggia *et al.*, “Evidence for brain glial activation in chronic pain patients,” *Brain J. Neurol.*, vol. 138, no. Pt 3, pp. 604–615, Mar. 2015, doi: 10.1093/brain/awu377.
- [213] A. G. Vanderwall and E. D. Milligan, “Cytokines in Pain: Harnessing Endogenous Anti-Inflammatory Signaling for Improved Pain Management,” *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 3009, Dec. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.03009.
- [214] M. Calvo, J. M. Dawes, and D. L. H. Bennett, “The role of the immune system in the generation of neuropathic pain,” *Lancet Neurol.*, vol. 11, no. 7, pp. 629–642, Jul. 2012, doi: 10.1016/S1474-4422(12)70134-5.

- [215] M. Y. Karavis, I. Siafaka, A. Vadalouca, and G. Georgoudis, "Role of Microglia in Neuropathic Pain," *Cureus*, vol. 15, no. 8, p. e43555, Aug. 2023, doi: 10.7759/cureus.43555.
- [216] M. Calvo and D. L. H. Bennett, "The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury," *Exp. Neurol.*, vol. 234, no. 2, pp. 271–282, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.018.
- [217] C. R. Donnelly *et al.*, "Central Nervous System Targets: Glial Cell Mechanisms in Chronic Pain," *Neurotherapeutics*, vol. 17, no. 3, pp. 846–860, Jul. 2020, doi: 10.1007/s13311-020-00905-7.
- [218] R.-R. Ji, C. R. Donnelly, and M. Nedergaard, "Astrocytes in chronic pain and itch," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 20, no. 11, pp. 667–685, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41583-019-0218-1.
- [219] T. Cheng, Z. Xu, and X. Ma, "The role of astrocytes in neuropathic pain," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 15, p. 1007889, Sep. 2022, doi: 10.3389/fnmol.2022.1007889.
- [220] Y.-J. Gao and R.-R. Ji, "Targeting astrocyte signaling for chronic pain," *Neurotherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 482–493, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.nurt.2010.05.016.
- [221] A. Hald, S. Nedergaard, R. R. Hansen, M. Ding, and A.-M. Heegaard, "Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain," *Eur. J. Pain Lond. Engl.*, vol. 13, no. 2, pp. 138–145, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.ejpain.2008.03.014.
- [222] Y.-W. Duan, S.-X. Chen, Q.-Y. Li, and Y. Zang, "Neuroimmune Mechanisms Underlying Neuropathic Pain: The Potential Role of TNF- α -Necroptosis Pathway," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 13, p. 7191, Jun. 2022, doi: 10.3390/ijms23137191.
- [223] R. Guo, J. Gu, S. Zong, M. Wu, and M. Yang, "Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain," *Biomed. J.*, vol. 41, no. 1, pp. 9–20, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.bj.2017.12.001.
- [224] X.-F. Han, F.-Y. Chen, J.-H. Zhong, and R.-R. Ouyang, "[Mitochondria-mediated apoptosis induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL-60 cells]," *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, vol. 20, no. 1, pp. 73–77, Feb. 2012.
- [225] L. Galluzzi, O. Kepp, C. Trojel-Hansen, and G. Kroemer, "Mitochondrial control of cellular life, stress, and death," *Circ. Res.*, vol. 111, no. 9, pp. 1198–1207, Oct. 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268946.
- [226] N. S. Chandel, "Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles," *Cell Metab.*, vol. 22, no. 2, pp. 204–206, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.013.
- [227] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, and A. Meisel, "Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function," *Trends Neurosci.*, vol. 36, no. 10, pp. 587–597, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
- [228] M. S. Patel and T. E. Roche, "Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes," *FASEB J.*, vol. 4, no. 14, pp. 3224–3233, 1990, doi: 10.1096/fasebj.4.14.2227213.
- [229] B. A. Walter Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter, "Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts," in *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed., W.W. Norton & Company, 2015.

- [230] A. Bratic and N.-G. Larsson, "The role of mitochondria in aging," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 3, pp. 951–957, Mar. 2013, doi: 10.1172/JCI64125.
- [231] J. K. Salabei, A. A. Gibb, and B. G. Hill, "Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis," *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 2, pp. 421–438, Feb. 2014, doi: 10.1038/nprot.2014.018.
- [232] A. Cassina and R. Radi, "Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 328, no. 2, pp. 309–316, Apr. 1996, doi: 10.1006/abbi.1996.0178.
- [233] A. M. Cassina *et al.*, "Cytochrome c nitration by peroxynitrite," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 28, pp. 21409–21415, Jul. 2000, doi: 10.1074/jbc.M909978199.
- [234] B. Sui *et al.*, "Understanding the role of mitochondria in the pathogenesis of chronic pain," *Postgrad. Med. J.*, vol. 89, no. 1058, pp. 709–714, Dec. 2013, doi: 10.1136/postgradmedj-2012-131068.
- [235] R. Radi, A. Cassina, and R. Hodara, "Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria," *Biol. Chem.*, vol. 383, no. 3–4, pp. 401–409, 2002, doi: 10.1515/BC.2002.044.
- [236] O. Warburg, F. Wind, and E. Negelein, "THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY," *J. Gen. Physiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 519–530, Mar. 1927.
- [237] E. Obre and R. Rossignol, "Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 59, pp. 167–181, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.008.
- [238] P. Cassina, E. Miquel, L. Martínez-Palma, and A. Cassina, "Glial Metabolic Reprogramming in Amyotrophic Lateral Sclerosis," *Neuroimmunomodulation*, vol. 28, no. 4, pp. 204–212, Jun. 2021, doi: 10.1159/000516926.
- [239] M. K. Jha, I.-K. Lee, and K. Suk, "Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase-lactic acid axis: Linking metabolism and diverse neuropathophysiology," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 68, pp. 1–19, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.006.
- [240] L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Sweet sixteen for ANLS," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 7, pp. 1152–1166, Jul. 2012, doi: 10.1038/jcbfm.2011.149.
- [241] N. D. Halim *et al.*, "Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons," *Glia*, vol. 58, no. 10, pp. 1168–1176, Aug. 2010, doi: 10.1002/glia.20996.
- [242] A. Almeida, J. Almeida, J. P. Bolaños, and S. Moncada, "Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 15294–15299, Dec. 2001, doi: 10.1073/pnas.261560998.
- [243] J. P. Bolaños, "Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity," *J. Neurochem.*, vol. 139 Suppl 2, no. Suppl Suppl 2, pp. 115–125, Oct. 2016, doi: 10.1111/jnc.13486.
- [244] A. Flowers, H. Bell-Temin, A. Jalloh, S. M. Stevens, and P. C. Bickford, "Proteomic analysis of aged microglia: shifts in transcription, bioenergetics, and nutrient response,"

- J. Neuroinflammation*, vol. 14, no. 1, p. 96, May 2017, doi: 10.1186/s12974-017-0840-7.
- [245] G. Bonvento and J. P. Bolaños, “Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity,” *Cell Metab.*, vol. 33, no. 8, pp. 1546–1564, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.cmet.2021.07.006.
- [246] L. F. Barros and B. Weber, “CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain,” *J. Physiol.*, vol. 596, no. 3, pp. 347–350, Feb. 2018, doi: 10.1113/JP274944.
- [247] L. Pellerin and P. J. Magistretti, “Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 22, pp. 10625–10629, Oct. 1994.
- [248] J. P. Bolaños, A. Almeida, and S. Moncada, “Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway?,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 35, no. 3, pp. 145–149, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.006.
- [249] A. Almeida, S. Moncada, and J. P. Bolaños, “Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 45–51, Jan. 2004, doi: 10.1038/ncb1080.
- [250] Y. Zhang *et al.*, “An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex,” *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 36, pp. 11929–11947, Sep. 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- [251] A. Herrero-Mendez, A. Almeida, E. Fernández, C. Maestre, S. Moncada, and J. P. Bolaños, “The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 747–752, Jun. 2009, doi: 10.1038/ncb1881.
- [252] R. Afridi, J.-H. Kim, M. H. Rahman, and K. Suk, “Metabolic Regulation of Glial Phenotypes: Implications in Neuron–Glia Interactions and Neurological Disorders,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 14, Feb. 2020, doi: 10.3389/fncel.2020.00020.
- [253] X.-Y. Xiong, Y. Tang, and Q.-W. Yang, “Metabolic changes favor the activity and heterogeneity of reactive astrocytes,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 33, no. 6, pp. 390–400, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.tem.2022.03.001.
- [254] L. Martínez-Palma, E. Miquel, V. Lagos-Rodríguez, L. Barbeito, A. Cassina, and P. Cassina, “Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1^{G93A} Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, vol. 16, no. 1, pp. 203–215, Jan. 2019, doi: 10.1007/s13311-018-0659-7.
- [255] P. Cassina *et al.*, “Mitochondrial Dysfunction in SOD1^{G93A}-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 16, pp. 4115–4122, Apr. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008.
- [256] C. Fiebig *et al.*, “Mitochondrial Dysfunction in Astrocytes Impairs the Generation of Reactive Astrocytes and Enhances Neuronal Cell Death in the Cortex Upon Photothrombotic Lesion,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 12, p. 40, Feb. 2019, doi: 10.3389/fnmol.2019.00040.
- [257] X. Ma *et al.*, “Astrocytic pyruvate dehydrogenase kinase-lactic acid axis involvement in glia-neuron crosstalk contributes to morphine-induced hyperalgesia in mice,” *Fundam.*

- Res., vol. 4, no. 4, pp. 820–828, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.fmre.2023.02.013.
- [258] C. Lauro and C. Limatola, “Metabolic Reprograming of Microglia in the Regulation of the Innate Inflammatory Response,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 493, Mar. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00493.
- [259] R. Orihuela, C. A. McPherson, and G. J. Harry, “Microglial M1/M2 polarization and metabolic states,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 4, pp. 649–665, Feb. 2016, doi: 10.1111/bph.13139.
- [260] M. L. Bennett *et al.*, “New tools for studying microglia in the mouse and human CNS,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 12, pp. E1738–E1746, Mar. 2016, doi: 10.1073/pnas.1525528113.
- [261] S. Ghosh, E. Castillo, E. S. Frias, and R. A. Swanson, “Bioenergetic regulation of microglia,” *Glia*, vol. 66, no. 6, pp. 1200–1212, Jun. 2018, doi: 10.1002/glia.23271.
- [262] L. A. Voloboueva, J. F. Emery, X. Sun, and R. G. Giffard, “Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin,” *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 6, pp. 756–762, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.067.
- [263] A. Rubio-Araiz, O. M. Finucane, S. Keogh, and M. A. Lynch, “Anti-TLR2 antibody triggers oxidative phosphorylation in microglia and increases phagocytosis of β -amyloid,” *J. Neuroinflammation*, vol. 15, no. 1, p. 247, Aug. 2018, doi: 10.1186/s12974-018-1281-7.
- [264] A. McIntosh *et al.*, “Iron accumulation in microglia triggers a cascade of events that leads to altered metabolism and compromised function in APP/PS1 mice,” *Brain Pathol.*, vol. 29, no. 5, pp. 606–621, 2019, doi: 10.1111/bpa.12704.
- [265] P. J. Magistretti and I. Allaman, “A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging,” *Neuron*, vol. 86, no. 4, pp. 883–901, May 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035.
- [266] P. W. Stacpoole *et al.*, “Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children,” *Pediatrics*, vol. 117, no. 5, pp. 1519–1531, May 2006, doi: 10.1542/peds.2005-1226.
- [267] J. Thorsten R. Knoechel *et al.*, “Regulatory Roles of the N-Terminal Domain Based on Crystal Structures of Human Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 Containing Physiological and Synthetic Ligands†,‡,” ACS Publications. Accessed: Dec. 21, 2023. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi051402s>
- [268] E. Miquel *et al.*, “Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 70, pp. 204–213, May 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019.
- [269] E. Miquel *et al.*, “Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis,” *PloS One*, vol. 7, no. 4, p. e34776, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0034776.
- [270] J. J. Collier, M. Oláhová, T. G. McWilliams, and R. W. Taylor, “Mitochondrial signalling and homeostasis: from cell biology to neurological disease,” *Trends Neurosci.*, vol. 46, no. 2, pp. 137–152, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.tins.2022.12.001.
- [271] P. Cassina *et al.*, “Mitochondrial Dysfunction in SOD1G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted

- Antioxidants," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 16, pp. 4115–4122, Apr. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008.
- [272] S. Moradi Vastegani *et al.*, "Mitochondrial Dysfunction and Parkinson's Disease: Pathogenesis and Therapeutic Strategies," *Neurochem. Res.*, vol. 48, no. 8, pp. 2285–2308, Aug. 2023, doi: 10.1007/s11064-023-03904-0.
- [273] J. van den Ameele *et al.*, "Chronic pain is common in mitochondrial disease," *Neuromuscul. Disord.*, vol. 30, no. 5, pp. 413–419, May 2020, doi: 10.1016/j.nmd.2020.02.017.
- [274] H. K. Kim *et al.*, "Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain," *Pain*, vol. 111, no. 1, pp. 116–124, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.pain.2004.06.008.
- [275] H. Zheng, W. H. Xiao, and G. J. Bennett, "Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy," *Exp. Neurol.*, vol. 232, no. 2, pp. 154–161, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.016.
- [276] H. F. Galley, B. McCormick, K. L. Wilson, D. A. Lowes, L. Colvin, and C. Torsney, "Melatonin limits paclitaxel-induced mitochondrial dysfunction in vitro and protects against paclitaxel-induced neuropathic pain in the rat," *J. Pineal Res.*, vol. 63, no. 4, p. e12444, Nov. 2017, doi: 10.1111/jpi.12444.
- [277] A. Areti, P. Komirishetty, M. Akuthota, R. A. Malik, and A. Kumar, "Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and promotes neuroprotection by inducing autophagy during oxaliplatin-evoked peripheral neuropathy," *J. Pineal Res.*, vol. 62, no. 3, Apr. 2017, doi: 10.1111/jpi.12393.
- [278] W. Almutawa *et al.*, "The R941L mutation in MYH14 disrupts mitochondrial fission and associates with peripheral neuropathy," *EBioMedicine*, vol. 45, pp. 379–392, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.06.018.
- [279] L. F. Ferrari and J. D. Levine, "Alcohol consumption enhances antiretroviral painful peripheral neuropathy by mitochondrial mechanisms," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 32, no. 5, pp. 811–818, Sep. 2010, doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07355.x.
- [280] P. Fernyhough, S. K. Roy Chowdhury, and R. E. Schmidt, "Mitochondrial stress and the pathogenesis of diabetic neuropathy," *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, vol. 5, no. 1, pp. 39–49, Jan. 2010, doi: 10.1586/eem.09.55.
- [281] R. Mitchell, G. Campbell, M. Mikolajczak, K. McGill, D. Mahad, and S. M. Fleetwood-Walker, "A Targeted Mutation Disrupting Mitochondrial Complex IV Function in Primary Afferent Neurons Leads to Pain Hypersensitivity Through P2Y1 Receptor Activation," *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 8, pp. 5917–5933, Aug. 2019, doi: 10.1007/s12035-018-1455-4.
- [282] B.-L. Guo *et al.*, "Significant changes in mitochondrial distribution in different pain models of mice," *Mitochondrion*, vol. 13, no. 4, pp. 292–297, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.mito.2013.03.007.
- [283] X.-J. Chen, L. Wang, and X.-Y. Song, "Mitoquinone alleviates vincristine-induced neuropathic pain through inhibiting oxidative stress and apoptosis via the improvement of mitochondrial dysfunction," *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.*, vol. 125, p. 110003, May 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110003.

- [284] A. K. Clark, C. Gentry, E. J. Bradbury, S. B. McMahon, and M. Malcangio, "Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation," *Eur. J. Pain*, vol. 11, no. 2, pp. 223–230, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.ejpain.2006.02.003.
- [285] K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores, and J. Joris, "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia," *Pain*, vol. 32, no. 1, pp. 77–88, Jan. 1988, doi: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.
- [286] S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, and T. L. Yaksh, "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw," *J. Neurosci. Methods*, vol. 53, no. 1, pp. 55–63, Jul. 1994, doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- [287] W. J. Dixon, "Efficient Analysis of Experimental Observations," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 20, no. 1, pp. 441–462, Apr. 1980, doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.
- [288] M. D. Brand and D. G. Nicholls, "Assessing mitochondrial dysfunction in cells," *Biochem. J.*, vol. 435, no. 2, pp. 297–312, Apr. 2011, doi: 10.1042/BJ20110162.
- [289] M. García-Roche, A. Casal, M. Carriquiry, R. Radi, C. Quijano, and A. Cassina, "Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies," *Redox Biol.*, vol. 17, pp. 207–212, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.redox.2018.03.008.
- [290] A. V. Kuznetsov, V. Veksler, F. N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter, and W. S. Kunz, "Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 6, pp. 965–976, Jun. 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.61.
- [291] M. J. Broadhead *et al.*, "Nanostructural Diversity of Synapses in the Mammalian Spinal Cord," *Sci. Rep.*, vol. 10, p. 8189, May 2020, doi: 10.1038/s41598-020-64874-9.
- [292] T. Crisp, T. O. Minus, M. L. Coleman, J. R. Giles, C. Cibula, and E. P. Finnerty, "Aging, peripheral nerve injury and nociception: Effects of the antioxidant 16-desmethylnitrazepam," *Behav. Brain Res.*, vol. 166, no. 1, pp. 159–165, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.bbr.2005.07.006.
- [293] R. R. Myers, H. M. Heckman, and M. Rodriguez, "Reduced Hyperalgesia in Nerve-Injured WLD Mice: Relationship to Nerve Fiber Phagocytosis, Axonal Degeneration, and Regeneration in Normal Mice," *Exp. Neurol.*, vol. 141, no. 1, pp. 94–101, Sep. 1996, doi: 10.1006/exnr.1996.0142.
- [294] S. L. Stuesse, W. L. R. Cruce, J. A. Lovell, D. L. McBurney, and T. Crisp, "Microglial proliferation in the spinal cord of aged rats with a sciatic nerve injury," *Neurosci. Lett.*, vol. 287, no. 2, pp. 121–124, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0304-3940(00)01142-3.
- [295] C. J. Garrison, P. M. Dougherty, K. C. Kajander, and S. M. Carlton, "Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury," *Brain Res.*, vol. 565, no. 1, pp. 1–7, Nov. 1991, doi: 10.1016/0006-8993(91)91729-K.
- [296] H. Ma *et al.*, "Excitation-transcription coupling, neuronal gene expression and synaptic plasticity," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 24, no. 11, pp. 672–692, Nov. 2023, doi: 10.1038/s41583-023-00742-5.
- [297] T. Rosenberg *et al.*, "The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 7, p. 86, Nov. 2014, doi: 10.3389/fnmol.2014.00086.
- [298] D. R. Zimmermann and M. T. Dours-Zimmermann, "Extracellular matrix of the central

- nervous system: from neglect to challenge," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 130, no. 4, pp. 635–653, Oct. 2008, doi: 10.1007/s00418-008-0485-9.
- [299] M. DI and R. K, "Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain," *J. Neurochem.*, vol. 60, no. 2, Feb. 1993, doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03165.x.
- [300] J. Gotts, L. Atkinson, Y. Yanagawa, J. Deuchars, and S. A. Deuchars, "Co-expression of GAD67 and choline acetyltransferase in neurons in the mouse spinal cord: A focus on lamina X," *Brain Res.*, vol. 1646, pp. 570–579, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.001.
- [301] C. Shimizu-Okabe *et al.*, "Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 2, p. 834, Jan. 2022, doi: 10.3390/ijms23020834.
- [302] K. A. Moore, T. Kohno, L. A. Karchewski, J. Scholz, H. Baba, and C. J. Woolf, "Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 15, pp. 6724–6731, Aug. 2002, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06724.2002.
- [303] N. V. Gulyaeva, "Glucocorticoid Regulation of the Glutamatergic Synapse: Mechanisms of Stress-Dependent Neuroplasticity," *J. Evol. Biochem. Physiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 564–576, May 2021, doi: 10.1134/S0022093021030091.
- [304] G. Bt and Z. L, "Neuroplasticity: an appreciation from synapse to system," *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 93, no. 10, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.apmr.2012.04.026.
- [305] M. W. Salter, "Cellular neuroplasticity mechanisms mediating pain persistence," *J. Orofac. Pain*, vol. 18, no. 4, pp. 318–324, 2004.
- [306] X. J. Liu and M. W. Salter, "Glutamate Receptor Phosphorylation and Trafficking in Pain Plasticity in Spinal Cord Dorsal Horn," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 32, no. 2, pp. 278–289, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07351.x.
- [307] M. Kurabe, M. Sasaki, K. Furutani, H. Furue, Y. Kamiya, and H. Baba, "Structural and functional properties of spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury change overtime via astrocyte activation," *iScience*, vol. 25, no. 12, p. 105555, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.105555.
- [308] Y. Tang *et al.*, "VGLUT2/Cdk5/p25 Signaling Pathway Contributed to Inflammatory Pain by Complete Freund's Adjuvant," *Pain Res. Manag.*, vol. 2020, p. 4807674, Feb. 2020, doi: 10.1155/2020/4807674.
- [309] Z. Zi *et al.*, "Wnt1/β-catenin signaling upregulates spinal VGLUT2 expression to control neuropathic pain in mice," *Neuropharmacology*, vol. 164, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107869.
- [310] J. Park *et al.*, "Central Mechanisms Mediating Thrombospondin-4-induced Pain States," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 25, pp. 13335–13348, Jun. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.723478.
- [311] L. Di Cesare Mannelli *et al.*, "α-Conotoxin RgIA protects against the development of nerve injury-induced chronic pain and prevents both neuronal and glial derangement," *Pain*, vol. 155, no. 10, pp. 1986–1995, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.pain.2014.06.023.
- [312] V. Mussetto, A. Moen, L. Trofimova, J. Sandkühler, and R. Hogri, "Differential activation of spinal and parabrachial glial cells in a neuropathic pain model," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 17, p. 1163171, Apr. 2023, doi: 10.3389/fncel.2023.1163171.

- [313] I. Lopez-Fabuel *et al.*, “Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 46, pp. 13063–13068, Nov. 2016, doi: 10.1073/pnas.1613701113.
- [314] M. Hüttemann, I. Lee, L. Samavati, H. Yu, and J. W. Doan, “Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 12, pp. 1701–1720, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.001.
- [315] M. L. Genova and G. Lenaz, “Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1837, no. 4, pp. 427–443, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.11.002.
- [316] D. T. Hass and C. J. Barnstable, “Uncoupling Proteins in the Mitochondrial Defense Against Oxidative Stress,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 83, p. 100941, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.100941.
- [317] S. J. L. Flatters, “Chapter Five - The Contribution of Mitochondria to Sensory Processing and Pain,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 131, T. J. Price and G. Dussor, Eds., in Molecular and Cell Biology of Pain, vol. 131. , Academic Press, 2015, pp. 119–146. doi: 10.1016/bs.pmbts.2014.12.004.
- [318] M. K. Jha *et al.*, “Metabolic Connection of Inflammatory Pain: Pivotal Role of a Pyruvate Dehydrogenase Kinase-Pyruvate Dehydrogenase-Lactic Acid Axis,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 42, pp. 14353–14369, Oct. 2015, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1910-15.2015.
- [319] N. A. Duggett, L. A. Griffiths, and S. J. L. Flatters, “Paclitaxel-induced painful neuropathy is associated with changes in mitochondrial bioenergetics, glycolysis, and an energy deficit in dorsal root ganglia neurons,” *Pain*, vol. 158, no. 8, pp. 1499–1508, Aug. 2017, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000939.
- [320] T. K. Y. Lim, M. B. Rone, S. Lee, J. P. Antel, and J. Zhang, “Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in trauma-induced painful peripheral neuropathy,” *Mol. Pain*, vol. 11, p. 58, Sep. 2015, doi: 10.1186/s12990-015-0057-7.
- [321] C. A. Galloway, H. Lee, and Y. Yoon, “Mitochondrial morphology – Emerging role in bioenergetics,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 12, p. 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035.
- [322] H. Kanda *et al.*, “Inhibition of Mitochondrial Fission Protein Reduced Mechanical Allodynia and Suppressed Spinal Mitochondrial Superoxide Induced by Perineural Human Immunodeficiency Virus gp120 in Rats,” *Anesth. Analg.*, vol. 122, no. 1, p. 264, Jan. 2016, doi: 10.1213/ANE.0000000000000962.
- [323] G. Keilhoff, A. Becker, S. Kropf, and L. Schild, “Sciatic nerve ligation causes impairment of mitochondria associated with changes in distribution, respiration, and cardiolipin composition in related spinal cord neurons in rats,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 421, no. 1–2, pp. 41–54, Oct. 2016, doi: 10.1007/s11010-016-2782-2.
- [324] A. Schmidtke, “Nitric oxide-mediated pain processing in the spinal cord,” *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 227, pp. 103–117, 2015, doi: 10.1007/978-3-662-46450-2_6.
- [325] H. Y. Kim, J. M. Chung, and K. Chung, “Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: The effect of mitochondrial

- electron transport complex inhibitors," *Neurosci. Lett.*, vol. 447, no. 1, pp. 87–91, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.041.
- [326] C. Bae, J. Wang, H. S. Shim, S.-J. Tang, J. M. Chung, and J.-H. La, "Mitochondrial superoxide increases excitatory synaptic strength in spinal dorsal horn neurons of neuropathic mice," *Mol. Pain*, vol. 14, p. 1744806918797032, 2018, doi: 10.1177/1744806918797032.
- [327] S. Toyama, N. Shimoyama, Y. Ishida, T. Koyasu, H. H. Szeto, and M. Shimoyama, "Characterization of Acute and Chronic Neuropathies Induced by Oxaliplatin in Mice and Differential Effects of a Novel Mitochondria-targeted Antioxidant on the Neuropathies," *Anesthesiology*, vol. 120, no. 2, pp. 459–473, Feb. 2014, doi: 10.1097/01.anes.0000435634.34709.65.
- [328] J. van Horssen, P. van Schaik, and M. Witte, "Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders?," *Neurosci. Lett.*, vol. 710, p. 132931, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.050.
- [329] A. Almeida, M. Delgado-Esteban, J. P. Bolaños, and J. M. Medina, "Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture," *J. Neurochem.*, vol. 81, no. 2, pp. 207–217, Apr. 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00827.x.
- [330] P. W. Stacpoole *et al.*, "Evaluation of Long-term Treatment of Children With Congenital Lactic Acidosis With Dichloroacetate," *Pediatrics*, vol. 121, no. 5, pp. e1223–e1228, May 2008, doi: 10.1542/peds.2007-2062.
- [331] M. O. James, S. C. Jahn, G. Zhong, M. G. Smeltz, Z. Hu, and P. W. Stacpoole, "Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1," *Pharmacol. Ther.*, vol. 170, pp. 166–180, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.10.018.
- [332] P. W. Stacpoole, C. J. Martyniuk, M. O. James, and N. A. Calcutt, "Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy," *Int. Rev. Neurobiol.*, vol. 145, pp. 211–238, 2019, doi: 10.1016/bs.irm.2019.05.003.
- [333] O. A. Andreassen *et al.*, "Dichloroacetate exerts therapeutic effects in transgenic mouse models of Huntington's disease," *Ann. Neurol.*, vol. 50, no. 1, pp. 112–117, Jul. 2001, doi: 10.1002/ana.1085.
- [334] E. D. Michelakis *et al.*, "Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate," *Sci. Transl. Med.*, vol. 2, no. 31, p. 31ra34, May 2010, doi: 10.1126/scitranslmed.3000677.
- [335] P. W. Stacpoole, "Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 109, no. 11, Nov. 2017, doi: 10.1093/jnci/djx071.
- [336] P. W. Stacpoole, G. N. Henderson, Z. Yan, R. Cornett, and M. O. James, "Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate," *Drug Metab. Rev.*, vol. 30, no. 3, pp. 499–539, Aug. 1998, doi: 10.3109/03602539808996323.
- [337] M. K. Jha, S. Jeon, and K. Suk, "Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glial Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 10, no. 4, pp. 393–403, Dec. 2012, doi: 10.2174/157015912804143586.

- [338] E. Miquel, R. Villarino, L. Martínez-Palma, A. Cassina, and P. Cassina, "Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration," *Glia*, vol. 72, no. 5, pp. 999–1011, May 2024, doi: 10.1002/glia.24516.
- [339] M. K. Jha, S. Jeon, and K. Suk, "Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain," *Immune Netw.*, vol. 12, no. 2, pp. 41–47, Apr. 2012, doi: 10.4110/in.2012.12.2.41.
- [340] Y. Itoh *et al.*, "Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 8, pp. 4879–4884, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0831078100.
- [341] M. M. Bowker-Kinley, W. I. Davis, P. Wu, R. A. Harris, and K. M. Popov, "Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex," *Biochem. J.*, vol. 329, no. Pt 1, pp. 191–196, Jan. 1998.
- [342] H.-L. Lee, K.-M. Lee, S.-J. Son, S.-H. Hwang, and H.-J. Cho, "Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model," *Neuroreport*, vol. 15, no. 18, pp. 2807–2811, Dec. 2004.
- [343] M. K. Jha *et al.*, "Pyruvate dehydrogenase kinase 2 and 4 gene deficiency attenuates nociceptive behaviors in a mouse model of acute inflammatory pain," *J. Neurosci. Res.*, vol. 94, no. 9, pp. 837–849, Sep. 2016, doi: 10.1002/jnr.23727.
- [344] M. Vilaseca *et al.*, "Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat hepatic stellate cells and reduces portal hypertension in cirrhotic rats," *Liver Int.*, vol. 37, no. 7, pp. 1002–1012, 2017, doi: 10.1111/liv.13436.
- [345] J. Leitner *et al.*, "Impaired Excitatory Drive to Spinal Gabaergic Neurons of Neuropathic Mice," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 8, p. e73370, Aug. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0073370.
- [346] T. L. Yaksh, "Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists," *Pain*, vol. 37, no. 1, pp. 111–123, Apr. 1989, doi: 10.1016/0304-3959(89)90160-7.
- [347] R. Kuner, "Spinal excitatory mechanisms of pathological pain," *Pain*, vol. 156 Suppl 1, pp. S11–S17, Apr. 2015, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000118.
- [348] S. Tansley *et al.*, "Microglia-mediated degradation of perineuronal nets promotes pain," *Science*, vol. 377, no. 6601, pp. 80–86, Jul. 2022, doi: 10.1126/science.abl6773.
- [349] G. Mascio *et al.*, "A Progressive Build-up of Perineuronal Nets in the Somatosensory Cortex Is Associated with the Development of Chronic Pain in Mice," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 42, no. 14, pp. 3037–3048, Apr. 2022, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1714-21.2022.
- [350] A. K. Simhal, Y. Zuo, M. M. Perez, D. V. Madison, G. Sapiro, and K. D. Micheva, "Multifaceted Changes in Synaptic Composition and Astrocytic Involvement in a Mouse Model of Fragile X Syndrome," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 13855, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50240-x.
- [351] M. J. Broadhead *et al.*, "PSD95 nanoclusters are postsynaptic building blocks in hippocampus circuits," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 24626, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24626.

- [352] A. K. Simhal *et al.*, “Probabilistic fluorescence-based synapse detection,” *PLOS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 4, p. e1005493, Apr. 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005493.
- [353] N. R. Wilson *et al.*, “Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1,” *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 26, pp. 6221–6234, Jun. 2005, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3003-04.2005.
- [354] M. A. Herman, F. Ackermann, T. Trimbuch, and C. Rosenmund, “Vesicular Glutamate Transporter Expression Level Affects Synaptic Vesicle Release Probability at Hippocampal Synapses in Culture,” *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 35, pp. 11781–11791, Aug. 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1444-14.2014.
- [355] D. Irala *et al.*, “Astrocyte-Secreted Neurocan Controls Inhibitory Synapse Formation and Function,” *bioRxiv*, p. 2023.04.03.535448, Apr. 2023, doi: 10.1101/2023.04.03.535448.
- [356] X. Zhang *et al.*, “Shank3 contributes to neuropathic pain by facilitating the SNI-dependent increase of HCN2 and the expression of PSD95,” *Neurosci. Res.*, vol. 166, pp. 34–41, May 2021, doi: 10.1016/j.neures.2020.05.010.
- [357] J. Wang *et al.*, “SNAP-25 Contributes to Neuropathic Pain by Regulation of VGLuT2 Expression in Rats,” *Neuroscience*, vol. 423, pp. 86–97, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.007.
- [358] M. Al-Khrasani *et al.*, “Glycine transporter inhibitors: A new avenue for managing neuropathic pain,” *Brain Res. Bull.*, vol. 152, pp. 143–158, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.07.008.
- [359] E. D. Milligan and L. R. Watkins, “Pathological and protective roles of glia in chronic pain,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 10, no. 1, p. 23, Jan. 2009, doi: 10.1038/nrn2533.
- [360] M. W. Roomi, J. C. Monterrey, T. Kalinovsky, M. Rath, and A. Niedzwiecki, “Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in normal human cell lines,” *Oncol. Rep.*, vol. 21, no. 3, pp. 821–826, Mar. 2009.
- [361] R. Vallejo, D. M. Tilley, L. Vogel, and R. Benyamin, “The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain,” *Pain Pract. Off. J. World Inst. Pain*, vol. 10, no. 3, pp. 167–184, 2010, doi: 10.1111/j.1533-2500.2010.00367.x.
- [362] Y. Kawasaki *et al.*, “Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain,” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 3, p. 331, Feb. 2008, doi: 10.1038/nm1723.
- [363] W.-T. Liu, Y. Han, Y.-P. Liu, A. A. Song, B. Barnes, and X.-J. Song, “Spinal Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Physical Dependence on Morphine in Mice,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 22, p. 7613, Jun. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1358-10.2010.
- [364] L. Jiang *et al.*, “Selective suppression of the JNK-MMP2/9 signal pathway by tetramethylpyrazine attenuates neuropathic pain in rats,” *J. Neuroinflammation*, vol. 14, p. 174, Aug. 2017, doi: 10.1186/s12974-017-0947-x.
- [365] Y. Kato *et al.*, “Acidic Extracellular pH Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Mouse Metastatic Melanoma Cells through the Phospholipase D-Mitogen-activated Protein Kinase Signaling*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 12, pp. 10938–10944, Mar. 2005, doi: 10.1074/jbc.M411313200.
- [366] J. Dahlhamer *et al.*, “Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain

- Among Adults - United States, 2016,” *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 67, no. 36, pp. 1001–1006, Sep. 2018, doi: 10.15585/mmwr.mm6736a2.
- [367] J. Durán, M. Tejos-Bravo, V. Cid, C. Ferreccio, and M. Calvo, “Chronic pain in Chile: first prevalence report of noncancer chronic pain, fibromyalgia, and neuropathic pain and its associated factors,” *PAIN*, vol. 164, no. 8, p. 1852, Aug. 2023, doi: 10.1097/j.pain.0000000000002886.
- [368] J. S. Mogil, “Perspective: Equality need not be painful,” *Nature*, vol. 535, no. 7611, p. S7, Jul. 2016, doi: 10.1038/535S7a.
- [369] E. Barcelon, S. Chung, J. Lee, and S. J. Lee, “Sexual Dimorphism in the Mechanism of Pain Central Sensitization,” *Cells*, vol. 12, no. 16, p. 2028, Aug. 2023, doi: 10.3390/cells12162028.
- [370] D. Cabañero, E. Villalba-Riquelme, G. Fernández-Ballester, A. Fernández-Carvajal, and A. Ferrer-Montiel, “ThermoTRP channels in pain sexual dimorphism: new insights for drug intervention,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 240, p. 108297, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108297.
- [371] G. Chen, X. Luo, M. Y. Qadri, T. Berta, and R.-R. Ji, “Sex-Dependent Glial Signaling in Pathological Pain: Distinct Roles of Spinal Microglia and Astrocytes,” *Neurosci. Bull.*, vol. 34, no. 1, p. 98, Jun. 2017, doi: 10.1007/s12264-017-0145-y.
- [372] S. Schmidt, T. Arendt, M. Morawski, and M. Sonntag, “Neurocan Contributes to Perineuronal Net Development,” *Neuroscience*, vol. 442, pp. 69–86, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.040.
- [373] M. Heshmati *et al.*, “Depression and Social Defeat Stress Are Associated with Inhibitory Synaptic Changes in the Nucleus Accumbens,” *J. Neurosci.*, vol. 40, no. 32, p. 6228, Aug. 2020, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2568-19.2020.
- [374] T. M. Smith, D. Lee, K. Bradley, and S. B. McMahon, “Methodology for quantifying excitability of identified projection neurons in the dorsal horn of the spinal cord, specifically to study spinal cord stimulation paradigms,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 330, p. 108479, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.108479.
- [375] K. Agashkov *et al.*, “Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 19231, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55462-7.
- [376] B. V. Safronov and P. Szucs, “Novel aspects of signal processing in lamina I,” *Neuropharmacology*, vol. 247, p. 109858, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.neuropharm.2024.109858.
- [377] Y. Li, S. Su, J. Yu, M. Peng, S. Wan, and C. Ke, “Electrophysiological Properties of Substantia Gelatinosa Neurons in the Preparation of a Slice of Middle-Aged Rat Spinal Cord,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 13, Mar. 2021, doi: 10.3389/fnagi.2021.640265.
- [378] A. J. Todd, “Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn,” *Mol. Pain*, vol. 13, p. 1744806917693003, Jan. 2017, doi: 10.1177/1744806917693003.

ANEXO: PUBLICACIÓN

Mitochondrial bioenergetics, glial reactivity, and pain-related behavior can be restored by dichloroacetate treatment in rodent pain models

Valentina Lagos-Rodríguez^a, Laura Martínez-Palma^a, Soledad Marton^a, Ernesto Miquel^a, Ricardo Escobar-Pintos^a, Adriana Cassina^b, Natalia Lago^c, Patricia Cassina^{a,*}

Abstract

Glial reactivity in the dorsal horn of the spinal cord is a hallmark in most chronic pain conditions. Neuroinflammation-associated reactive glia, in particular astrocytes, have been shown to exhibit reduced mitochondrial respiratory function. Here, we studied the mitochondrial function at the lumbar spinal cord tissue from complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain rat and chronic constriction injury mouse models by high-resolution respirometry. A significant decrease in mitochondrial bioenergetic parameters at the injury-related spinal cord level coincided with highest astrogliosis. Oral administration of dichloroacetate (DCA) significantly increased mitochondrial respiratory function by inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase and decreased glial fibrillary acidic protein and Iba-1 immunoreactivity in spinal cord. Importantly, DCA treatment significantly reduced the ipsilateral pain-related behavior without affecting contralateral sensitivity in both pain models. Our results indicate that mitochondrial metabolic modulation with DCA may offer an alternative therapeutic strategy to alleviate chronic and persistent inflammatory pain.

Keywords: Mitochondria, Pain, Astrocytes, Microglia, Dichloroacetate

1. Introduction

Pain conditions are associated with functional and structural changes in the nociceptive neurons and glial cells, mainly in the spinal cord dorsal horn (SCDH) ipsilateral to the affected side.⁴⁸ Reactive gliosis, a critical player in chronic neuroinflammation that involves microglia and astrocytes, has been observed in various neuropathic and inflammatory pain conditions.^{8,30,48,52} Although different in embryonic origin, morphology, and function, astrocytes and microglia share properties as innate-immune-competent cells in the central nervous system, bearing plastic phenotypes. Indeed, they can be polarized to develop either a neurotrophic/anti-inflammatory or neurotoxic/proinflammatory phenotype in response to different signals.²⁷ After increased input from the periphery, microglia and astrocytes activate and release pronociceptive mediators such as ATP, cytokines, and chemokines, which

contribute to central sensitization.³⁰ The temporal course of activation and experimental inhibition of specific glial cells in pain models are consistent with a role for microglial cells in initiating enhanced pain responses,^{36,51,52} whereas astrocytes would be implicated in pain persistence and chronification.^{9,10,65} In fact, a critical role for astrocytes in chronic pain is supported by results showing pain hypersensitivity-induction by optogenetic activation of these cells at the SCDH in naive rats.⁴⁶

One of the hallmarks of neuroinflammation is a change in glial energy metabolism.^{20,53,62} In addition to their role in ATP production by the oxidative phosphorylation (OXPHOS) through the electron transport chain (ETC), mitochondria are involved in many other cellular processes including synthesis and catabolism of metabolites and generation of reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS and RNS, respectively).^{4,50} Morphological and functional alterations in mitochondria have been reported in patients and animal models of pathological pain^{15,20,62}; however, deeper understanding of spinal cord mitochondrial metabolic changes in pain conditions is lacking.

We have previously reported that both astrocytes and whole spinal cord tissue isolated from animal models of a neurodegenerative disease (amyotrophic lateral sclerosis [ALS]) exhibit reduced mitochondrial respiratory function associated with glial reactivity.^{6,40,43,44} However, the spinal cord mitochondrial function associated with glial activation in pain pathogenesis remains underexplored.

Metabolic modulation by dichloroacetate (DCA) reestablished mitochondrial function and reduced neuronal loss and glial reactivity in ALS models.^{40,43} Dichloroacetate is a well-characterized inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK), a mitochondrial enzyme that regulates glucose metabolism by switching off the mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH) complex (PDHC) through phosphorylation of the E1 α subunit. PDHC catalyzes the reaction that

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

^a Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ^b Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ^c Neuroinflammation and Gene Therapy Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

*Corresponding author. Address: Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. General Flores 2125 CP11800. Tel.: 0598 2924 2703. E-mail address: patricia.cassina@gmail.com (P. Cassina).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painjournalonline.com).

PAIN 00 (2020) 1–12

© 2020 International Association for the Study of Pain

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001992>

converts pyruvate into acetyl coenzyme A, the primary fuel of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, thus linking glycolysis to OXPHOS.^{25,57} Then, PDK inhibition by DCA stimulates mitochondrial respiratory activity.^{57,59}

Here, we evaluate spinal cord mitochondrial respiratory function in two pain models with a typical temporal course of glial reactivity characterized by transient activation of microglia and sustained astrogliosis.^{18,52,61} We also evaluated whether metabolic modulation by DCA affects glial reactivity, cytokine mRNA expression profile, or the generation and persistence of pain.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Dichloroacetate and all other reagents were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) unless otherwise specified.

2.2. Animals

All experimental and surgical procedures using laboratory animals were approved by the Institutional Animal Committee: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA; <https://chea.edu.uy/>); protocol # 070153-000528-14, or IPMon Animal Care Committee and conducted according to the Uruguayan National Law (# 18,611), guidelines of the European Commission on Animal Care and NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.⁴⁷ Adult male C57BL/6 mice (weighed 25–30 g at the time of the injury) or adult male Sprague-Dawley rats (weighed 200–250 g at the time of the injury) were maintained in a controlled environment (12-hour light–dark cycle; 20 ± 1°C) with ad libitum access to food and water. A total of 69 rats and 85 mice were used in this study, and experiments were designed to minimize the number of animals.

2.3. Pain models and dichloroacetate treatment

2.3.1. Chronic constriction injury model

Chronic constriction injury (CCI) of the common sciatic nerve was performed in mice according to the method described by Bennett and Xie.³ Animals were anesthetized with ketamine–xylazine (90–10 mg/kg, i.p.), and the common sciatic nerve was exposed at the midhigh level and freed of adhering tissue. Three loose ligatures (5–0 mononylon Ethilon sutures; Ethicon) were tied around the nerve with about 1-mm interval between each ligature. The wound was closed and disinfected. After surgery, mice recovered on a thermal pad at 27°C.

Chronic constriction injury was performed on the right hind paw (unilateral CCI) except for high-resolution respirometry studies, in which both hind paws were lesioned (bilateral CCI).

2.3.2. Complete Freund's adjuvant inflammatory model

A 50- μ L suspension of complete Freund's adjuvant (CFA; 1 μ g/ μ L; Sigma) was injected into the plantar surface of the right hind paw of the rats to induce persistent inflammatory pain.⁵²

2.3.3. Treatments

Dichloroacetate was administered in the drinking water at a 500 mg/L concentration and the solution was prepared fresh twice a week as previously described,^{40,43} starting at the day of injury and maintained until the time of sample collection. For glial reactivity

studies, 3 time points were assessed: 3, 7, and 19 days for CCI mice; and 3, 7 and 13 days for CFA-injected rats. For respirometry, Western blot, and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) studies, sample collection was performed after 19 days in CCI mice and 13 days in CFA-injected rats, based on the time needed to achieve maximum astrogliosis in the spinal cord of untreated animals.

2.3.4. Treatment groups

For each study, CFA-injected rats and unilateral CCI mice were divided randomly into 2 groups, one of which received DCA in the drinking water starting at the day of the injury, whereas the other group received regular drinking water (vehicle). In most of the performed experiments, the data to be compared were obtained from samples ipsilateral or contralateral to the lesion from DCA or vehicle-treated animals. A group of vehicle-treated animals were left uninjured (naive animals) for controls in molecular biology experiments. Due to technical difficulties for the manipulation of mouse hemispinal cord samples for respirometry, these studies were performed on bilateral CCI and naive mice as controls that were randomly assigned to DCA or vehicle treatment.

2.4. Immunofluorescence

Animals were deeply anesthetized (pentobarbital, 50 mg/kg i.p.) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde fixative in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). Lumbar spinal cord (L4–L6) was dissected out, postfixed in the same fixative for 24 hours, and cryoprotected in 30% sucrose in DPBS for 48 hours at 4°C. The samples were snap-frozen in cryoembedding compound (Tissue-tek OCT; Sakura) until sectioning. Transverse spinal cord sections (30- μ m thick) were obtained using a Leica CM1850UV cryostat and free-floating processed for immunofluorescence. Sections were permeabilized in 0.2% Triton X-100 diluted in DPBS, and unspecific binding was blocked with blocking solution (BS, 10% goat serum + 2% bovine serum albumin, BSA + 0.2% Triton X-100 in DPBS). Sections destined to identify astrocytes were subjected to direct immunofluorescence using a mouse monoclonal Cy3-conjugated anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; Sigma; 1:600; overnight at 4°C) and those used to detect microglia were incubated with a rabbit monoclonal antibody against the ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1; Wako, FUJIFILM Wako Chemicals, Richmond, VA; 1:1000) overnight at 4°C, followed by a goat anti-rabbit antibody conjugated to Alexa Fluor 488 dye (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; 1:1000) for one hour at room temperature. After washing, spinal cord sections were mounted with glycerol for microscopy analysis. Negative controls omitting the primary antibodies were included in each experiment. Images from the SCDH ipsilateral and contralateral to the lesion were obtained using an Olympus UPlanFL N 20x/0.50NA air objective (1-U2B525U) on an Olympus IX81 epifluorescence microscope coupled to a digital camera (Olympus DP71) or with an HCXPL APO 40x/1.25–0.75NA oil objective on a LEICA SP5 confocal microscope. All images were acquired with the same exposure parameters and were analyzed by an experimenter blinded to the treatment group.

Cell marker immunoreactivity (IR) quantification was performed in superficial SCDH from L4–L6 spinal cord sections using the basic tools of the ImageJ software (NIH). The superficial SCDH (laminae I–II) was manually delimited using the freehand selection tool (see supplemental Fig. 1B, Supplemental Digital Content 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B104>) and its total area was determined by selecting “measure” in the “Analyze” tab from the menu. Then,

images were thresholded to determine and measure the area occupied by the fluorescence. Glial fibrillary acidic protein- or Iba1-IR were expressed as percentage of the total region of interest (superficial SCDH area) as reported previously.^{43,44} The mean IR from 6 to 10 sections (separated by at least 300 μm) per animal ($n = 5$ -6 animals per group) was obtained for ipsilateral and contralateral SCDH. Results were expressed as percentage of contralateral SCDH in vehicle-treated animals.

2.5. Mitochondrial high-resolution respirometry

To evaluate the mitochondrial function in the lumbar spinal cord, tissue respiration was measured by high-resolution respirometry (HRR) using the Oxygraph 2 K respirometer (Oroboros Instruments Corp).⁴

2.5.1. Tissue collection and permeabilization

Animals were euthanized by deep anesthesia (pentobarbital 50 mg/kg i.p.), and lumbar spinal cord (L4-L6) was quickly dissected out and meninges were stripped; all procedures were conducted on ice. For the CFA model, rat L4-L6 spinal cord was sectioned in 2 halves, ipsilateral and contralateral to the paw injection. For the neuropathic pain model, the corresponding L4-L6 spinal cord of bilateral CCI mice was used, and samples from naive animals were included as controls. Four samples (from 2 rats or 4 mice) were examined at the same day using 2 respirometers (2 chambers each), with a random order of testing.

Fresh tissue samples were weighed and 5 to 8 mg were immediately permeabilized in ice-cold MIR05 respiration medium (0.5 mM EGTA, 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60 mM MOPS, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, 1 g/L BSA, pH 7.1) containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ saponin as previously described for other tissue samples,^{17,35} although permeabilization time was adjusted to 10 minutes evaluating coupling between respiration and OXPHOS by HRR.^{17,35} After permeabilization, each sample was washed with 1-mL ice-cold MIR05 respiration medium, and immediately placed in 2.4-mL chambers of the respirometer at 37°C.¹⁷

2.5.2. Oxygen consumption rate measurements

Oxygen consumption rate was recorded in MIR05 respiration medium at 37°C in the respirometer corrected by sample weight using the DatLab 4 analysis software and was expressed as $\text{pmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Protocol started with registration of the oxygen consumption rate of the permeabilized sample without the addition of substrates or inhibitors. Then, oxygen consumption rate was recorded after sequential addition of: (1) 20 mM succinate and (2) 4 mM adenosine diphosphate (ADP) to obtain the steady-state oxygen flux; (3) 2 μM oligomycin to inhibit ATP synthase; (4) carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) titration to uncouple OXPHOS from oxygen consumption rate (maximum uncoupling was acquired in the range of 1.5-2.4 μM); and finally (5) 2.5 μM antimycin A (AA; complex III inhibitor) to inhibit mitochondrial respiration and thus discriminate from nonmitochondrial oxygen consumption.

2.5.3. Respiratory parameters

After the assay, the following metabolic states or parameters were determined from the oxygen consumption slopes as described previously^{4,17}: State 4 respiration (after succinate addition), state 3

respiration (after ADP addition), ATP-independent respiration (oligomycin-resistant respiration), ATP-dependent respiration (OCR sensitive to the addition oligomycin destined to ATP synthesis, obtained by subtracting ATP-independent respiration from state 3 respiration), and maximum respiratory rate (highest slope value obtained after FCCP titration), as indicated in supplemental Figure 1A, Supplemental Digital Content 1 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B104>). Nonmitochondrial respiration obtained after AA inhibition of the ETC was subtracted from all values.

2.6. Western blot analysis

Animals were deeply anesthetized (pentobarbital, 50 mg/kg i.p.), and L4-L6 lumbar spinal cord samples ipsilateral to injury and from naive animals were homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Tris pH 8; 1% Triton X-100; 0.5% Na-deoxycholate; 0.1% SDS, and 150 mM NaCl) with 2 mM sodium orthovanadate. After quantification and denaturation, the samples were resolved by electrophoresis on 12% SDS-PAGE gels and then transferred into a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated for 1 hour at room temperature in blocking solution (5% Bovine serum albumin, 1% Tween 20 in PBS), and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-PDH-E1 α -pSer293 (1:500 in BS; Calbiochem, AP1062), mouse monoclonal anti-PDH-E1 α (1:500 in BS; Invitrogen, #456600), and mouse monoclonal anti-alpha-tubulin (1:3000 in BS; Abcam, ab184613) as loading control. Then, the membranes were washed and incubated for 1 hour at room temperature with IRDye 680RD-conjugated goat anti-mouse IgG and IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:15000 in PBS each, LI-COR Biosciences #926-68070 and #925-32218). The Odyssey system (LI-COR Biosciences) was used to detect the bands. Quantification of band intensity was performed using Image Studio software version 5.2.5. The relative levels of pSer293 E1 α and total E1 α were quantified. The pSer293 to total E1 α ratio was calculated and normalized against naive-vehicle spinal cord.

2.7. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Animals were deeply anesthetized (pentobarbital, 50 mg/kg i.p.), and L4-L6 lumbar spinal cord samples ipsilateral to injury and from naive animals were dissected out. Total RNA was extracted from tissue samples using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific) followed by chloroform extraction. RNA was purified from the aqueous phase using the GenElute Universal Total RNA Purification Kit (RNB100; Sigma) and reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen 28025-013) and random primers (for CCI mice) or oligo (dT) 12-18 primers (Thermo Fisher Scientific) (for ACF rats) following manufacturer instructions. Quantitative PCR (qRT-PCR) was performed using a Rotor-Gene 6000 System (Corbett Life Science, Sydney, Australia). All reactions were performed in triplicates in strip tubes (Axygen Brand Products).

For CCI mice samples, the following TaqMan reagents from Invitrogen/Applied Biosystems were used: TaqMan Fast Advanced Master Mix (1205919), exon-spanning probes for IL-1 β (Mm01336189_m1), TNF- α (Mm00443258_m1), Eukaryotic and 18S RNA endogenous control (FAM-MGB 4333760). Cycling conditions were 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

For CFA rat samples, cDNA was diluted in Biotools Quantimix Easy master mix (Biotools) in 10 μL volume. Specific forward and reverse primers (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)

sequences were as follows: for GAPDH F: 5'-CAC TGA GCA TCT CCC TCA CAA-3' and R: 5'-TGG TAT TCG AGA GAA GGG AGG-3', for IL-1 β F: 5'-TGC TGA TGT ACC AGT TGG GG-3' and R: 5'-CTC CAT GAG CTT TGT ACA AG-3' for TNF- α F: 5'-TGA TCG GTC CCA ACA AGG-3' and R: 5'-TGC TTG GTG GTT TGC TAC GA-3'. Cycling conditions were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 30 seconds, 56°C (IL-1 β and TNF- α) or 58°C (GAPDH) for 30 seconds, 95°C for 30 seconds, and 70°C for 30 seconds.

All data were analyzed using Rotor Gene 6000 software (Corbett Life Science Sydney, Australia). Quantification was performed with $\Delta\Delta C_t$ method using naive spinal cord samples as negative controls, and eukaryotic 18S RNA (for CCI mice) or GAPDH mRNA (for CFA rats) as reference.

2.8. Nociceptive behavior assessment

Thermal hyperalgesia was evaluated in both pain models, and mechanical allodynia was evaluated in the inflammatory pain model. The basal measurements were obtained 2 days before the injury. Nociceptive evaluations were performed between 10:00 AM and 5:00 PM blinded to treatment to avoid bias. Animals were acclimated to the testing room and equipment for 30 minutes before the actual test.

2.8.1. Thermal hyperalgesia

Thermal sensitivity was evaluated by measuring paw withdrawal latencies to a radiant heat stimulus using the Hargreaves apparatus (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA).²¹ The animals were placed in individual acrylic boxes over a tempered glass surface, and radiant heat source beneath the surface was aimed at the plantar surface of the hind paw. The seconds from initiation of thermal stimulus to removal of the hind paw (ipsilateral and contralateral to the site of injury) were recorded as paw withdrawal latency (PWL). A cutoff latency of 20 seconds was set to prevent tissue damage. Three trials on the same hind paw were performed with intervals of at least 6 minutes.

The PWLs were tested on days 1, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, and 19 after CCI; and on days 1, 2, 3, 6, 8, 10, and 13 after CFA injection.

2.8.2. Mechanical allodynia

Von Frey filaments (MARSTOCK^{nerve test}) were used to test mechanical allodynia in the hind paw (ipsilateral and contralateral to the site of injury).⁷ The animals were placed in individual acrylic boxes with a mesh bottom, which permitted easy access to the plantar surface of the paws. Filaments were applied to the midplantar region of the hind paw, perpendicular to the plantar surface, maintaining constant force to cause a slight bend for 8 seconds. Abrupt paw withdrawal was recorded as a positive response. A set of 8 filaments of logarithmically incremental force (4.62–52.5 g) were applied in descending or ascending order depending on the previous response to determine the response threshold.⁷ Based on the response pattern and the force of the final filament, the 50% response threshold was calculated using Dixon “up–down” method¹³ and was expressed as paw withdrawal threshold (PWT).

The PWTs were tested on days 1, 2, 3, 6, 8, 10, and 13 after CFA injection.

2.9. Data presentation, processing, and statistical analysis

Adobe Photoshop Cs6 software program was used to process images when indicated and to design figures. GraphPad Prism 5 software program was used to design figure graphs and data

analysis. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Paired one-tailed or two-tailed *t*-tests were performed to compare data with 2 experimental groups. One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc analysis was used to compare data from experiments with more than 2 groups. Statistical analysis of behavioral data was achieved using two-way analysis of variance for repeated measures followed by Tukey post hoc analysis. A value of $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. For each experiment and result, *n*, *p*, *F*, and/or *t* values are stated in figure or table legends.

3. Results

3.1. Decreased mitochondrial function in the lumbar spinal cord of animals undergoing pain

Mitochondrial respiration was assayed at the time when highest astrogliosis was detected in the SCDH ipsilateral to the lesion compared to the contralateral side. To corroborate previously published data, glial reactivity was analyzed by immunofluorescence against cell-specific markers, ie, GFAP for astrocytes and Iba-1 for microglia at 3 time points according to previous reports for CCI^{18,61} and CFA.⁵² The highest increase in GFAP-IR in the ipsilateral SCDH was identified at 19 days in CCI mice (Figs. 1A and B) and 13 days in CFA rats (Figs. 1C and D), compared to the respective contralateral side. However, microglial IR was detected earlier than astrocytic signal. The highest increase in Iba1 IR at the ipsilateral SCDH was found at 3 days after lesion in CCI animals and decreased in the following time points (see supplemental Fig. 2C, Supplemental Digital Content 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B104>). However, in CFA animals, the microglial marker was detected in higher levels at ipsilateral SCDH compared to contralateral at 7 days, without further increase at 13 days after injection (see supplemental Fig. 2F, Supplemental Digital Content 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B104>).

High-resolution respirometry revealed lower mitochondrial respiration in lumbar spinal cords from CCI mice compared to those obtained from spinal cord samples of naive animals (Figs. 1E and F). Remarkably, we detected significantly lower respiration in the lumbar spinal cord tissue ipsilateral to the damaged paw compared to the contralateral side in rats injected with CFA (Figs. 1G and H).

No differences were found in state 4 respiration (in presence of complex II-specific substrate succinate) between injury-related samples and naive ones in both pain models (Figs. 1F and H). However, compared to naive, CCI samples exhibited lower OCR values in the presence of saturating concentrations of succinate and ADP (state 3 respiration). The OCR for ATP production and after uncoupler exposure (lower maximum respiratory rate) was also reduced in CCI compared to naive samples indicating a diminished mitochondrial function (Fig. 1F). Importantly, in the inflammatory model, we found that the same parameters were significantly lower in the spinal cord samples ipsilateral to injury compared to the contralateral side samples taken from the same animal (Fig. 1H).

3.2. Improvement of mitochondrial respiratory function by oral administration of dichloroacetate in animals undergoing pain

To analyze the impact of mitochondrial respiratory activity in chronic and persistent pain, we treated the animals with DCA.

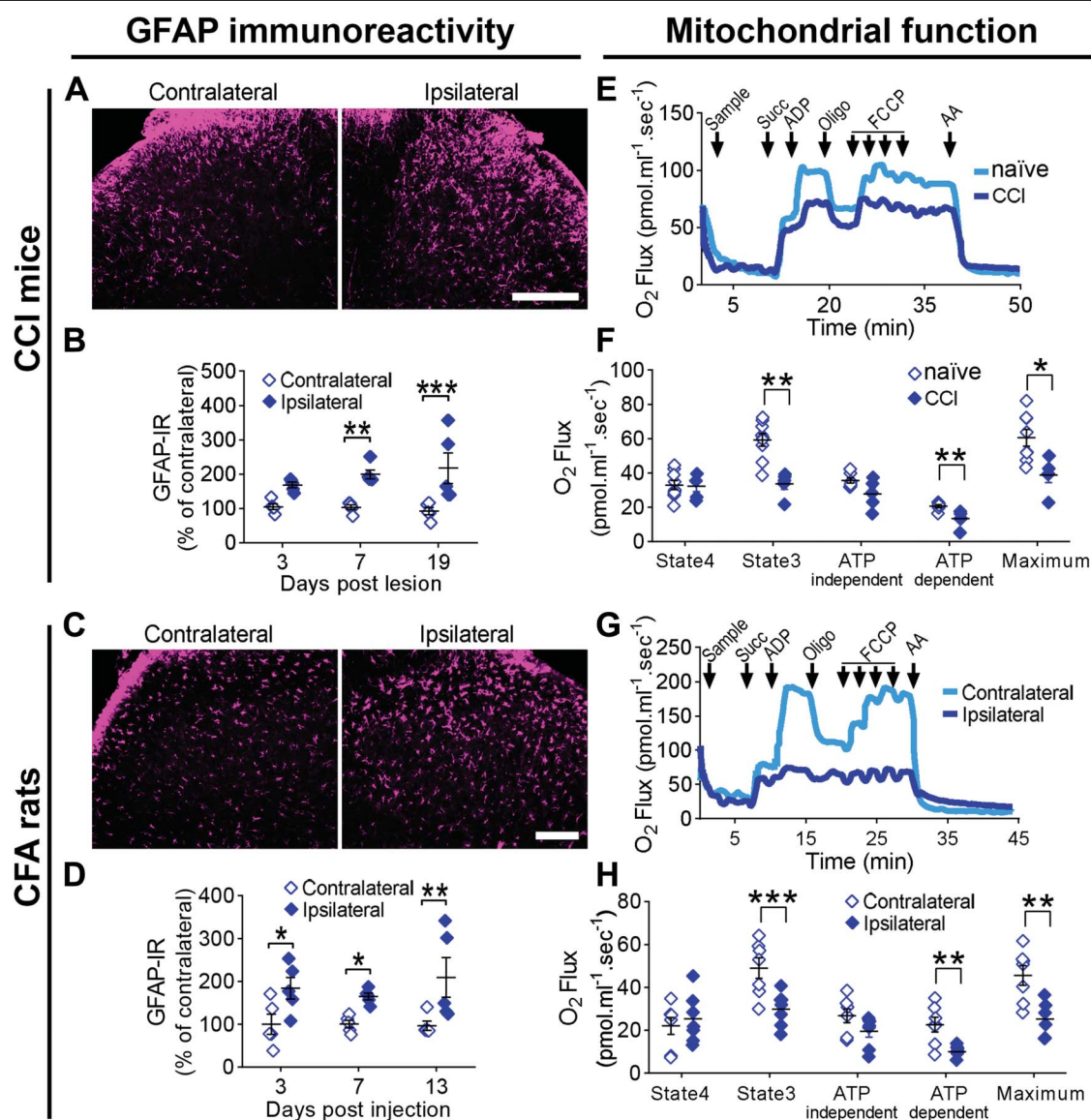


Figure 1. Mitochondrial function is reduced in the spinal cord of neuropathic and inflammatory pain animal models. (A–D) GFAP immunoreactivity (GFAP-IR) in spinal cord from neuropathic (CCI mice; A and B) and inflammatory (CFA rats; C and D) pain animals. Epifluorescence images from SCDH of contralateral and ipsilateral to injury as indicated, stained for GFAP at 19 (CCI, A) and 13 (CFA, C) days after injury. Scale bar = 200 μ m. GFAP-IR was quantified measuring the percentage of the total area occupied by immunoreactivity for GFAP at the head of SCDH ipsilateral and contralateral to lesion at indicated days postinjury in CCI mice (B) and CFA rats (D). $n = 5$ animals per group (average from a minimum of 6 spinal cord slices for each animal). For CCI model: 3 days postinjury: $P = 0.0761$, $t_4 = 2379$; 7 days postinjury: $P = 0.0021$, $t_4 = 7067$; 19 days postinjury: $P = 0.0002$, $t_4 = 13.26$. For CFA model: 3 days postinjury: $P = 0.0320$, $t_4 = 3229$; 7 days postinjury: $P = 0.0472$, $t_4 = 2833$; 13 days postinjury: $P = 0.0015$, $t_4 = 7695$. (E and G) Representative overlapped registers of O₂ Flux curves in L4-6 spinal cord fresh permeabilized samples for neuropathic mice (CCI) at 19 days after CCI or naïve mice (E), and for ipsilateral or contralateral L4-6 spinal cord in inflammatory pain rats (CFA rats) at 13 days after CFA injection (G). Succinate (Succ), Adenosine diphosphate (ADP), oligomycin (Oligo), FCCP, and antimycin A (AA) were added and respiratory parameters were obtained as described in methods. (F and H) Mitochondrial bioenergetic parameters for both models are shown. $n = 5$ to 9. In neuropathic pain model: for state 4: $P = 0.3657$, $t_4 = 0.3681$; for state 3: $P = 0.0041$, $t_4 = 4874$; for ATP independent: $P = 0.1851$, $t_3 = 1052$; for ATP dependent: $P = 0.0074$, $t_5 = 3645$; for Maximum respiratory rate (Maximum): $P = 0.0162$, $t_4 = 3217$. In inflammatory pain model: for state 4: $P = 0.2100$, $t_6 = 0.8654$; for state 3: $P = 0.0004$, $t_6 = 6191$; for ATP independent: $P = 0.0553$, $t_{12} = 1723$; for ATP dependent: $P = 0.0027$, $t_6 = 4235$; for Maximum: $P = 0.0059$, $t_5 = 3874$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ between indicated. GFAP, glial fibrillary acidic protein.

The compound was administered 500 mg/L in tap water, starting after injury induction and maintaining the treatment until Western blot and HRR studies were performed (19 days in the CCI-induced mice, or 13 days in CFA-injected rats).

To corroborate the previously reported effects of DCA on PDH, total and phosphorylated (pPDH) forms of the enzyme were quantified by Western blot assay using specific antibodies at the end of the respective treatments. Compared to naïve condition, relative levels of pPDH were not significantly

affected by CCI (**Fig. 2A**; adjusted P value after Tukey test = 0.9188) or CFA (**Fig. 2B**; adjusted P value after Tukey test = 0.1999) injury at the time points performed here. As expected, DCA treatment reduced pPDH relative levels in both naïve and injured spinal cord of mice (**Fig. 2A**) and rats (**Fig. 2B**), after 19 and 13 days of treatment, respectively, compared to vehicle-treated animals.

High-resolution respirometry studies indicated that DCA treatment significantly increased values of bioenergetic

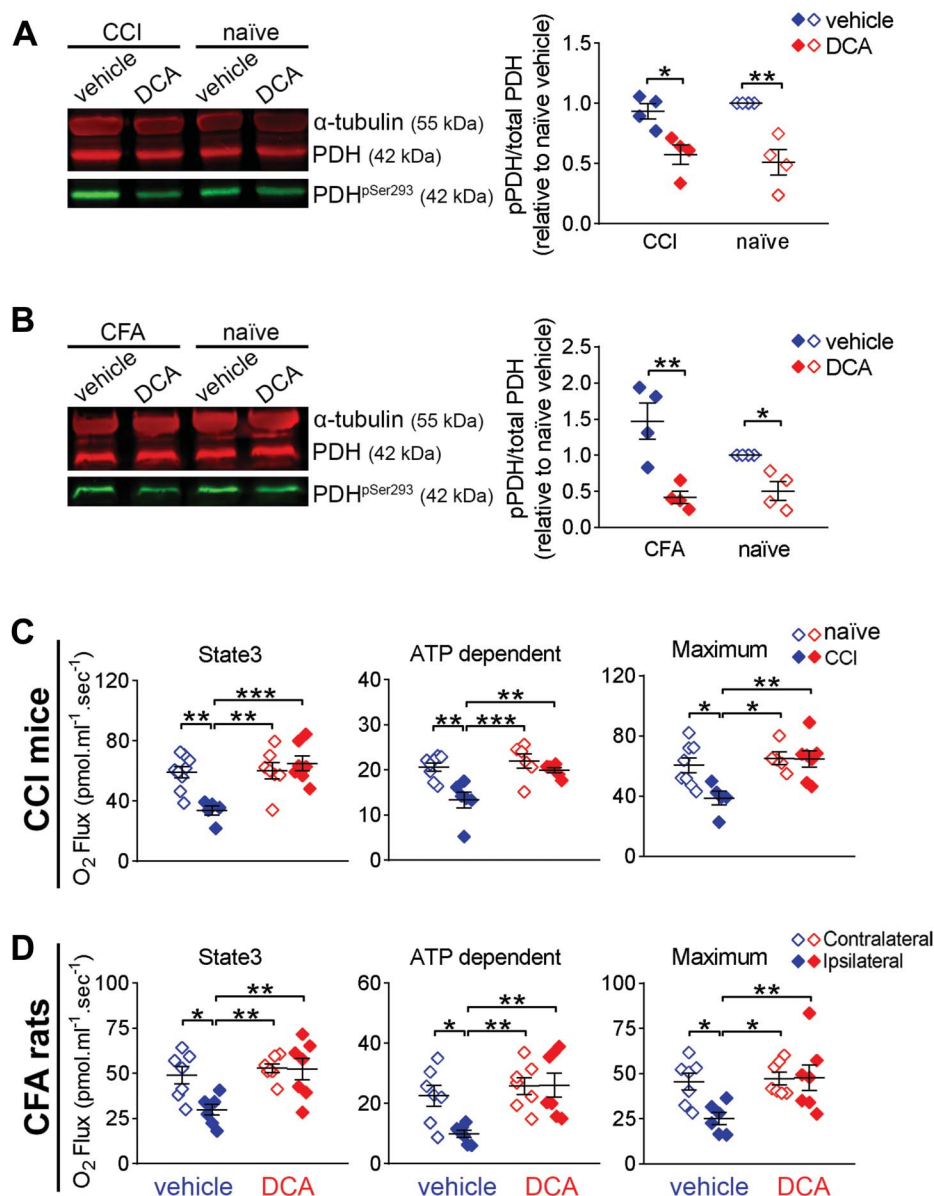


Figure 2. DCA improved mitochondrial bioenergetic parameters in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic and inflammatory pain. (A–B) Representative images of PDH-E1α (pSer293), total PDH-E1α, and α-tubulin immunoblots of ipsilateral L4–6 spinal cord samples. Samples were obtained from CCI or uninjured mice (naïve) (A, left) and from CFA-injected (CFA) or uninjured (naïve) rats (B, left). Animals were treated with DCA or vehicle as indicated. Right panels show the corresponding quantification of the PDH-E1α (pSer293) to total PDH-E1α ratio between relative densitometric levels normalized against naïve-vehicle. $n = 4$ animals per group in both models. For neuropathic pain model: $P < 0.0001$, $F_{4,13} = 21.40$; for inflammatory pain model: $P = 0.0010$, $F_{3,12} = 10.89$. (C and D) Bioenergetic parameters from L4–6 spinal cord samples from mice with bilateral CCI or naïve (C) and from CFA-injected rats, either ipsilateral or contralateral to CFA injection (D), treated either with vehicle or with DCA for 19 (CCI mice) or 13 (CFA rats) days after injury as indicated. $n = 5$ to 9 animals per group from 2 independent experiments for both models. One-way ANOVA results: In CCI mice: for state 3: $P = 0.0008$, $F_{3,24} = 7.848$; for ATP dependent: $P = 0.0005$, $F_{3,22} = 8.861$; for Maximum: $P = 0.0074$, $F_{3,21} = 5.246$. In CFA rats: for state 3: $P = 0.0022$, $F_{3,24} = 6.536$; ATP dependent: $P = 0.0029$, $F_{3,24} = 6.187$; Maximum: $P = 0.0138$, $F_{3,23} = 4.400$. Multiple comparison results: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ between indicated. ANOVA, analysis of variance; DCA, dichloroacetate.

mitochondrial parameters in the spinal cord of CCI mice compared to those detected in samples from vehicle-treated ones, and importantly, they reached the level of those obtained from naïve animals (**Fig. 2C**). Likewise, DCA treatment increased respiratory parameters measured in the rat spinal cord samples ipsilateral to CFA injection to the level of that obtained from the contralateral side of vehicle-treated animals (**Fig. 2D**). Dichloroacetate treatment did not modify the values obtained from contralateral or naïve spinal cord tissue (**Figs. 2C and D**).

3.3. Reduction of glial reactivity by dichloroacetate oral administration

To analyze whether DCA treatment could affect glial reactivity, GFAP and Iba1 immunofluorescence in the SCDH was studied at the time when HRR was previously assayed (**Fig. 3**).

Confocal microscopy images taken from SCDH (see supplemental Fig. 1C, Supplemental Digital Content 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B104>) revealed that DCA administration modified the morphology of astrocytes and

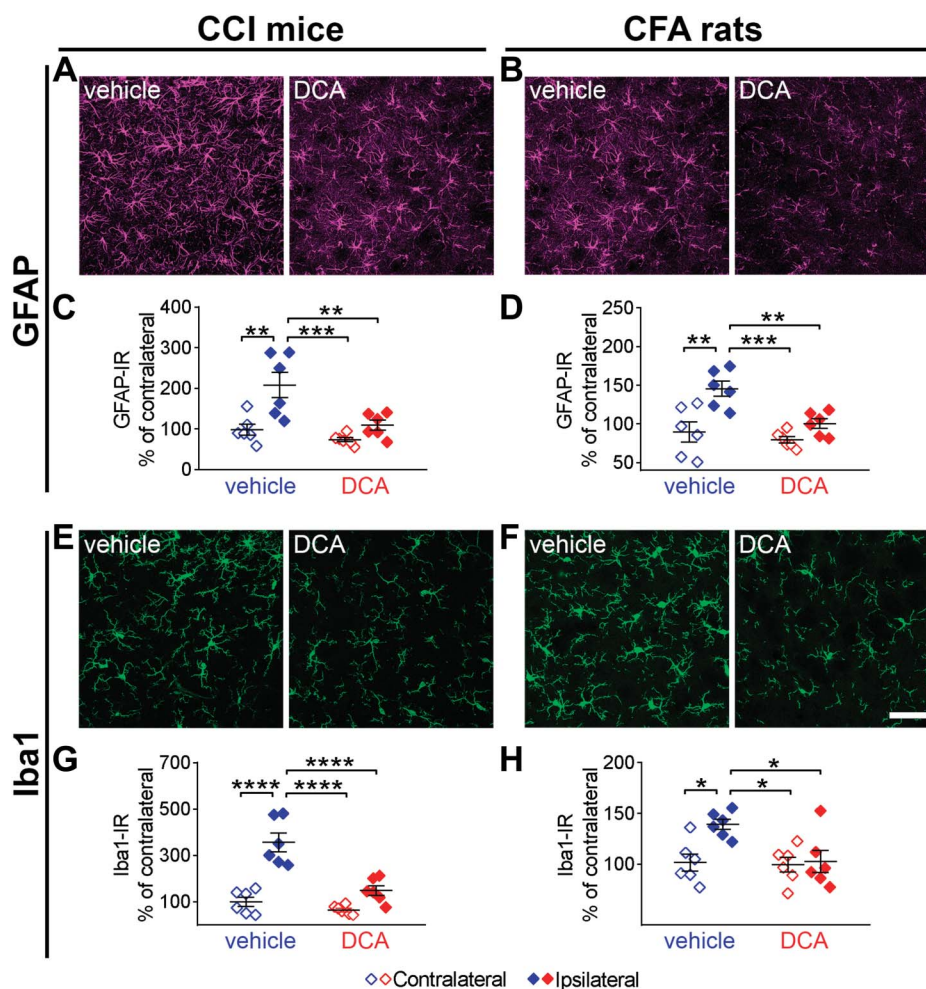


Figure 3. DCA reduced spinal cord gliosis in neuropathic and inflammatory pain animals. (A, B, E, F) Confocal images from GFAP (A and B) and Iba1 (E and F) -IR in ipsilateral SCDH head for neuropathic pain animals (CCI mice) at 19 days after CCI (A and E) and inflammatory pain animals (CFA rats) at 13 days after CFA injection (B and F). Scale bar = 50 μ m. (C, D, G, H) Quantification of GFAP and Iba-1 immunoreactivity in both pain models. Gliosis was quantified in the ipsilateral and contralateral SCDH head measuring the percentage of the total area occupied by immunoreactivity for GFAP and Iba-1. $n = 6$ animals per group from 2 independent experiments (average from a minimum of 6 spinal cord slices for each animal). One-way ANOVA results: for GFAP-IR in CCI mice; $P = 0.0002$, $F_{3,20} = 10.59$; for Iba-1-IR in CCI mice; $P < 0.0001$, $F_{3,20} = 26.51$; for GFAP-IR in CFA rats; $P = 0.0002$, $F_{3,20} = 10.58$; for Iba-1-IR in CFA rats; $P = 0.0073$, $F_{3,20} = 5.328$. Multiple-comparison results: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ between indicated. ANOVA, analysis of variance; DCA, dichloroacetate; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IR, immunoreactivity.

microglia in both CCI mice and CFA-injected rats. As previously reported,⁵² astrocytes exhibited intense GFAP-IR and appeared hypertrophied with thick processes in vehicle-treated CCI mice (Fig. 3A, left panel) and CFA-injected rats (Fig. 3B, left panel), whereas fine branched and sparsely distributed astrocytes were found in the DCA-treated animals in both models (Figs. 3A and B, right panels). As a result, significant differences were found in GFAP-IR in SCDH between the analyzed groups. Dichloroacetate administration induced a profound decrease in the area occupied by GFAP immunofluorescence in the ipsilateral SCDH from CCI (Fig. 3C) and CFA-injected (Fig. 3D) animals compared to vehicle-treated ones. No differences were found between GFAP-IR in ipsilateral SCDH after DCA treatment and contralateral SCDH from DCA- or vehicle-treated animals. No effects of DCA were seen in the contralateral side to injury neither in morphology (not shown) nor in the area occupied by GFAP immunofluorescence (Figs. 3C and D). Regarding Iba1-IR, positive cells displayed a morphology characteristic of mild activated microglia with short and thickened processes in the injury-

related SCDH from vehicle-treated CCI mice (Fig. 3E, left panel) and CFA rats (Fig. 3F, left panel) compared to the smaller soma and thinner ramifications observed in the SCDH from DCA-treated animals (Figs. 3E and F, right panels). In a similar way to GFAP, the area occupied by Iba1-IR in the injury-related SCDH was decreased after DCA treatment compared to SCDH samples from vehicle-treated animals in CCI (Fig. 3G) and CFA (Fig. 3H) models.

3.4. Dichloroacetate oral administration did not modify cytokine mRNA expression in the spinal cord of chronic constriction injury or complete Freund's adjuvant-injected animals

Gliosis has been found to parallel increases in mRNA levels of proinflammatory cytokines in the spinal cord of animals with chronic pain.^{37,52} To analyze whether cytokine mRNA levels were modified by DCA treatment, we measured the expression of IL-1 β and TNF- α mRNAs in the spinal cord of animals with CCI or CFA by qRT-PCR.

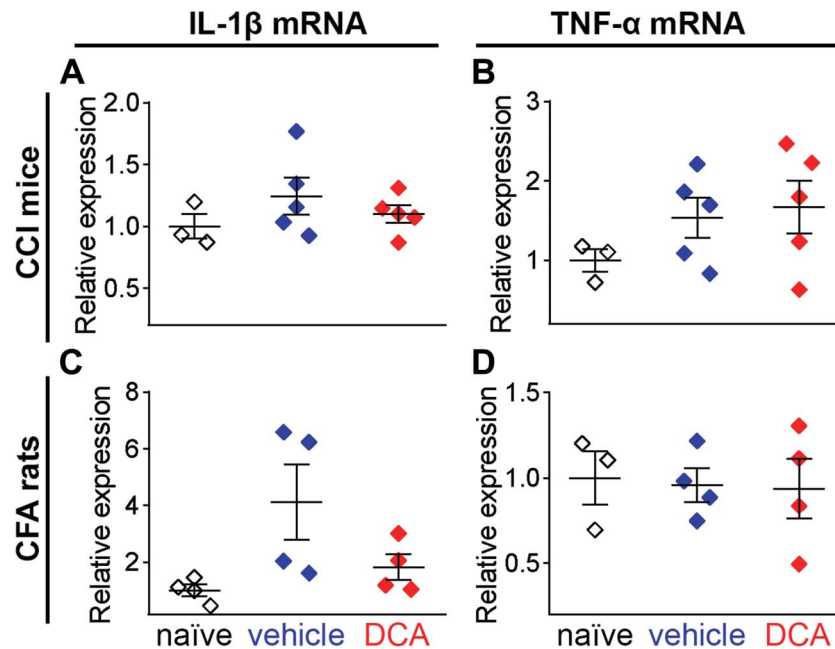


Figure 4. DCA did not modify IL-1 β and TNF- α mRNA expression in spinal cord samples from neuropathic and inflammatory pain animals. Relative expression of cytokines IL-1 β and TNF- α mRNA after DCA administration was analyzed by qRT-PCR at 19 days after CCI in mice (A and B) and 13 days after CFA injection in rats (C and D). qRT-PCR quantification was performed with $\Delta\Delta$ Ct method using the spinal cord ipsilateral to the injury for both pain models and GAPDH mRNA as reference. $n = 3$ –5 animals per group. One-way ANOVA results: In neuropathic pain model: for IL-1 β : $P = 0.3992$, $F_{2,10} = 1008$; for TNF- α : $P = 0.3356$, $F_{2,10} = 1220$. In inflammatory pain model: for IL-1 β : $P = 0.0612$, $F_{2,9} = 3872$; TNF- α : $P = 0.9580$, $F_{2,8} = 0.04312$. ANOVA, analysis of variance; DCA, dichloroacetate; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

As shown in **Figure 4**, at the time when HRR was performed, neither CCI (**Figs. 4A and B**) nor CFA injection (**Figs. 4C and D**) models exhibited significant differences in IL-1 β or TNF- α mRNAs expression at the injury-related spinal cord tissue compared to naïve samples and no differences were found with DCA treatment.

3.5. Reduction of pain-like behaviors allodynia and hyperalgesia by dichloroacetate oral administration

To address whether mitochondrial modulation by DCA treatment could alleviate pain hypersensitivity, thermal hyperalgesia was assessed after CCI over 19 days in mice treated with DCA or vehicle. In accordance to previous studies in rats^{3,11} or mice,⁴⁵ the ipsilateral PWL to hot stimuli was significantly reduced early after CCI compared to the contralateral side. Hyperalgesia was detected as soon as 1 day after injury and persisted until the last studied day (**Fig. 5A**). In DCA-treated CCI mice, ipsilateral PWL was significantly improved after 5 days of treatment and remained increased until the end of the studied period (**Fig. 5A**).

Pain-related behavior was monitored in rats over 13 days after injection of CFA to the hind paw followed by DCA or vehicle administration. In vehicle-treated animals, the ipsilateral PWL to thermal stimuli and the PWT to mechanical stimulation were significantly reduced in comparison with the contralateral paw and preinjured (basal) values (**Figs. 5B and C**). Dichloroacetate-treated animals significantly enhanced ipsilateral mechanical response threshold and thermal withdrawal latency after 8 days of treatment and further increased these parameters until they almost reached the levels detected at the contralateral paw (**Figs. 5B and C**).

In both models, the ipsilateral paw response to thermal stimuli in DCA-treated animals was not different compared to the

contralateral side from 12 days in CCI mice (**Fig. 5A**) and 6 days in CFA-injected rats (**Fig. 5B**) until the end of the assessed period. In the case of response to mechanical stimuli, no differences were found after 10 days (**Fig. 5C**).

No significant effect of DCA was found on contralateral paw compared to contralateral paw in vehicle-treated animals.

4. Discussion

This study reports reduced mitochondrial bioenergetic parameters in the spinal cord from rodent models of neuropathic and inflammatory chronic pain. Indeed, reduced parameters were detected at the ipsilateral spinal cord compared to the contralateral one from the same animal in the CFA injection model, suggesting that reduced respiratory activity is highly related to pain persistence and chronification mechanisms. Full assessment of the bioenergetic status in spinal cord tissue was performed by adaptation of previous permeabilization protocols.^{17,35,55} We found significantly lower values for state 3, ATP-dependent respiration and maximum respiratory capacity in injury-related spinal cord compared to the naïve or contralateral samples in both pain models. However, no differences were detected for state 4 respiration, indicating that mitochondria are partially uncoupled in the damage-related spinal cord samples and in turn restricting ATP availability and energetic supply. These results further support the recognized involvement of metabolic mitochondrial mechanisms in pathological pain.^{15,29,62} In fact, altered mitochondrial function has been found in dorsal root ganglia neurons¹⁴ and peripheral nerves^{39,64} from chemotherapy-associated^{14,64} and partial nerve ligation³⁹ pain models.

Our findings provide insight about bioenergetic changes in the spinal cord where the primary afferents synapse with the

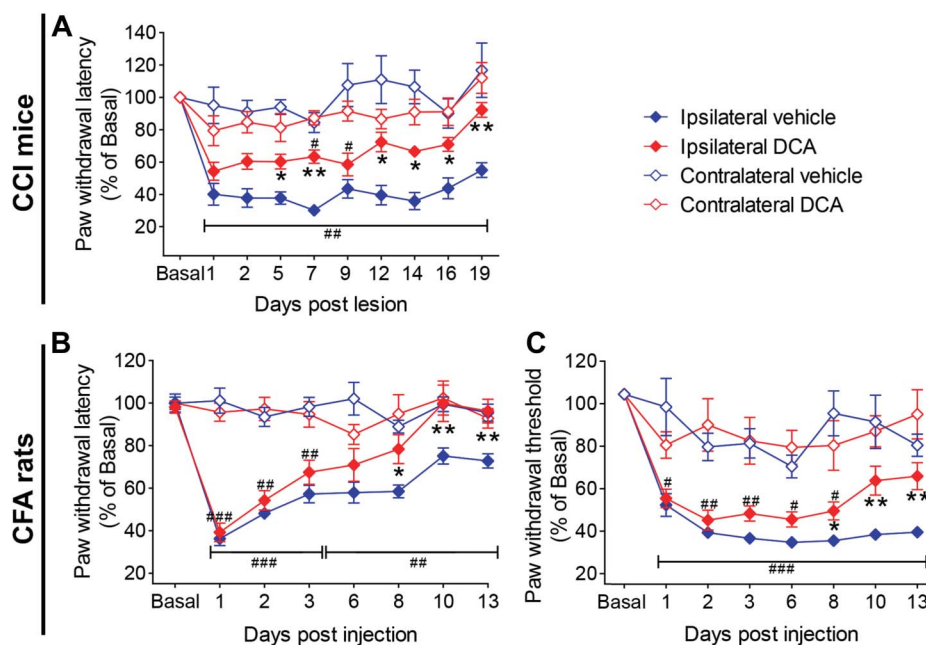


Figure 5. DCA reduced pain-related behavior in animals with neuropathic and inflammatory pain. (A and B) Evolution of thermal hyperalgesia for ipsilateral and contralateral paws of CCI mice (A) and CFA-injected rats (B) treated with DCA or vehicle. (C) Mechanical allodynia evolution in animals with inflammatory pain treated with DCA or vehicle. Two-way ANOVA-RM, for treatment effects: for thermal hyperalgesia in neuropathic pain model ($n = 4-5$ animals per group), $P < 0.0001$, $F_{3,14} = 28.08$; in inflammatory pain model ($n = 6$ animals per group), for thermal hyperalgesia: $P < 0.0001$, $F_{3,20} = 53.36$; for mechanical allodynia: $P < 0.0001$, $F_{3,25} = 20.39$. Multiple comparison results: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significantly different from ipsilateral vehicle paw. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ significantly different from contralateral paws (vehicle and DCA). ANOVA, analysis of variance; DCA, dichloroacetate.

secondary neurons in the pain pathway. More information about the role of mitochondria in pain has been provided by exploring mitochondrial dynamics. Inhibition of mitochondrial fission, which correlates with improvement of bioenergetic state,¹⁶ reduced HIV-induced mechanical allodynia³¹ in accordance with our results. Conversely, no modifications of spinal cord oxygen consumption rate in the presence of mitochondrial substrates and ADP were found at 7 and 14 days post-CCI in rats,³² although respiration linked to ATP synthesis was not assessed. Differences inherent to the species used or in tissue processing because it was homogenized may account for the discrepancies. Our results revealed reduced respiratory activity in intact spinal cord fragments from inflammatory and neuropathic pain-induced animals offering further support for mitochondrial dysfunction involvement in central sensitization.

The exact cause of decreased mitochondrial activity in the spinal cord in pain conditions is unknown. There are several mechanisms that modulate respiratory function, including substrate availability³⁸ and calcium entrance to mitochondria by glutamate/NMDA signaling.⁵⁴ In addition, elevated nitric oxide levels inhibit mitochondrial respiratory activity, which in turn enhance production of RNS.^{5,50} This phenomenon is particularly relevant in this model because nitric oxide production in the spinal cord is involved in the processing of persistent pain (reviewed in Ref. 56). Indeed, mitochondrial ETC complex inhibitors determined mechanical hyperalgesia by ROS/RNS-mediated mechanism in normal mice,³³ and mitochondrial-targeted antioxidants have been shown to prevent pain conditions.^{2,63} Tissue damage caused by excess ROS, induce neuroinflammation that includes activation of glial cells.²²

Our previous work showed reduced mitochondrial activity associated with spinal cord glial reactivity in ALS-mice.^{6,43} Herein, we describe altered mitochondrial bioenergetics at the

time of highest astrocyte reactivity at the SCDH in neuropathic and inflammatory pain conditions. The coincidental timing of these 2 phenomena is highly suggestive of a dependence between them. Although more selective isolation methods would be required to fully address the contribution of each cell type to the obtained bioenergetic parameters, it is known that proinflammatory states of immune cells and glia exhibit reduced OXPHOS and rely on aerobic glycolysis to increase availability of precursors for macromolecule biosynthesis.^{26,49} In this scenario, modulating metabolic phenotype seems to be an attractive strategy to apply in conditions associated with gliosis and neuroinflammation.

To answer whether mitochondrial metabolic modulation may affect pain sensitivity we used DCA, a drug that has been safely used in human congenital mitochondrialopathies⁵⁸ and cancer.²³ In addition, DCA treatments exhibited beneficial outcomes in neuropathologies associated with mitochondrial dysfunction such as ALS,^{40,43} Huntington disease,¹ and glioblastoma.⁴² The rationale for using DCA is its well-established PDK inhibiting activity.^{57,59} Pyruvate dehydrogenase kinase phosphorylates and inactivates the E1 subunit of PDHC, reducing the flow of glycolysis-derived pyruvate into the TCA cycle.^{25,34} Then, PDK inhibition by DCA stimulates mitochondrial respiration. Although one or more PDK isoforms have been involved in proinflammatory responses,²⁵ we did not find significant changes in relative levels of pPDH in the spinal cord after CCI or CFA induced pain, suggesting that phosphorylation of PDHC was not affected by pain status.

Despite the fact that increased relative pPDH, PDK2, and PDK4 levels were previously reported at the site of CFA injection, no changes were found in the expression and activity of PDK1-4 isoforms in the spinal cord in wild type mice.²⁹ However, proinflammatory metabolism is not necessarily associated to

reduced PDHC activity (increased pPDHC levels), as was reported for M1 macrophages in which sustained pyruvate entrance to remodeled TCA cycle leads to accumulation of citrate, itaconate, and succinate, necessary for proinflammatory eicosanoid synthesis, and also to HIF-1 α stabilization driving to upregulation of glycolytic enzymes and IL-1 β .^{12,41}

As expected, significantly reduced pPDH relative levels were found in the spinal cord after chronic DCA administration, and importantly, the treatment reestablished the bioenergetic status at the injury-related spinal cord when administered after pain induction in both models. However, as the drug was systemically administered, effects at the site of injury or other peripheral tissues cannot be discarded. Indeed, some studies have reported adverse side effects of DCA including peripheral neuropathy that is associated with thermal hypoalgesia, which would counter thermal hyperalgesia and explain our results. However, these data come from studies using a 5-fold higher dose and maintained for longer periods than the one we used (reviewed in Ref. 60). Also, data related to mechanical allodynia involved reduced PWL in accordance with our present work.

In addition to this, the improvement of mitochondrial respiratory activity by DCA treatment was accompanied by an important decline in the astrocytic marker GFAP in the injury-related SCDH at the contralateral side level, as detected by immunofluorescence. Accordingly, similar results showing a decrease in astroglial reactivity after improvement of mitochondrial function by DCA have been previously reported by our group in animal models of ALS.^{40,43} Moreover, DCA improved mitochondrial respiration in cultured astrocytes,⁴³ indicating that these cells may highly contribute to reduced mitochondrial respiration in the whole spinal cord and may be targets for DCA treatment. These effects on glial cell metabolism are important because they are fundamental players in neuroinflammation and they express different PDK isoforms.^{24,29} Astrocytes, being mainly glycolytic, may further enhance their glucose utilization by increasing the pentose phosphate pathway and TCA cycle activities under inflammatory conditions.¹⁹ Microglial proinflammatory phenotype is also linked to aerobic glycolytic metabolism,⁴⁹ because of which we cannot discard an effect of DCA on these cells in this study. Indeed, aberrant glial cells with astrocyte and microglial features improved their bioenergetic parameters after DCA treatment.⁴⁰ In the present work, Iba1-IR in the injury-related SCDH was reduced by DCA treatment. However, it was only slightly elevated in the CFA model compared to the contralateral side and was already decreased at the time when HRR was performed in CCI mice compared to earlier time points. Accordingly, no changes in the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β mRNA were found at this time point among injury-related and naive spinal cord tissue. These results are in agreement with previous data reported for a chronic injury rat model, where TNF- α and IL-1 β were found to be augmented during the first week after injury and by day 7 decreased to control concentrations.³⁷ On the contrary, increased proinflammatory cytokine levels after 14 days post-CFA injection in rats have been previously reported,⁵² although using a higher CFA dose than the one used in this study.

Importantly, beyond its effects on pain-associated glial reactivity and related mitochondrial function impairment, metabolic modulation by DCA had a significant effect on mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Previous work by Jha et al.^{28,29} showed a relationship between the PDK/PDHC axis and pain development using double knockout mice lacking PDK2 and PDK4. In this work, we show for the first time that pharmacological inhibition of PDK by systemic DCA treatment

administered after injury in wild-type rodents ameliorated both the spinal cord neuroinflammation and pain-related behavior.

In sum, our work reveals changes in spinal cord mitochondrial function in persistent inflammatory and chronic neuropathic pain models. We also demonstrate that by targeting the PDK/PDHC axis with short-term oral DCA administration after injury, mitochondrial bioenergetic parameters improve, glial reactivity in the spinal cord is reduced and most importantly, it can be effective in ameliorating pain-related behavior in both pain models. These results allow us to propose DCA as a therapeutic alternative that contributes to pathological pain treatment, a condition where few effective pharmacological tools exist in the present day. The fact that this drug has been previously used in humans is even more promising because it bridges the gap between preclinical and clinical studies.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We thank Mercedes García-Roche for precise and careful proofreading of the manuscript; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) fellowship to VLR; Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)-Universidad de la República (UDELAR), Programa Iniciación a la Investigación, Grant #87 to VLR; CSIC-UDELAR, Programa Grupos I+D, Grant #1104 to PC; Programa para el desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA); Fondo para la Convergencia Estructural del MERCOSUR (FOCEM), COF 03/1111; and Banco de Seguros del Estado (BSE).

Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B104>.

Article history:

Received 17 March 2020

Received in revised form 19 June 2020

Accepted 6 July 2020

Available online 10 July 2020

References

- Andreassen OA, Ferrante RJ, Huang HM, Dedeoglu A, Park L, Ferrante KL, Kwon J, Borchelt DR, Ross CA, Gibson GE, Beal MF. Dichloroacetate exerts therapeutic effects in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Ann Neurol* 2001;50:112–16.
- Bae C, Wang J, Shim HS, Tang SJ, Chung JM, La JH. Mitochondrial superoxide increases excitatory synaptic strength in spinal dorsal horn neurons of neuropathic mice. *Mol Pain* 2018;14:174480691879703.
- Bennett GJ, Xie Y. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *PAIN* 1988;33:87–107.
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011;435:297–312.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 1996;328:309–16.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de Leon A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci* 2008;28:4115–22.

- [7] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel J, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53:55–63.
- [8] Chen G, Zhang YQ, Qadri YJ, Serhan CN, Ji RR. Microglia in pain: detrimental and protective roles in pathogenesis and resolution of pain. *Neuron* 2018;100:1292–311.
- [9] Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 1997;79: 163–75.
- [10] Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 1999;157:289–304.
- [11] Crisp T, Minus TO, Coleman ML, Giles JR, Cibula C, Finnerty EP. Aging, peripheral nerve injury and nociception: effects of the antioxidant 16-desmethyltirilazad. *Behav Brain Res* 2006;166:159–65.
- [12] Diskin C, Pålsson-McDermott EM. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front Immunol* 2018;9:1–17.
- [13] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441–62.
- [14] Duggett NA, Griffiths LA, Flatters SJLL. Paclitaxel-induced painful neuropathy is associated with changes in mitochondrial bioenergetics, glycolysis, and an energy deficit in dorsal root ganglia neurons. *PAIN* 2017;158:1499–508.
- [15] Flatters SJLL. The contribution of mitochondria to sensory processing and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;131:119–46.
- [16] Galloway CA, Lee H, Yoon Y. Mitochondrial morphology—emerging role in bioenergetics. *Free Radic Biol Med* 2012;53:1–11.
- [17] García-Roche M, Casal A, Carriquiry M, Radi R, Quijano C, Cassina A. Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. *Redox Biol* 2018;17:207–12.
- [18] Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 1991;565:1–7.
- [19] Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia* 2008;56:975–89.
- [20] Grace PM, Gaudet AD, Staikopoulos V, Maier SF, Hutchinson MR, Salvemini D, Watkins LR. Nitroxidative signaling mechanisms in pathological pain. *Trends Neurosci* 2016;39:862–79.
- [21] Hargreaves KM, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *PAIN* 1988;32:77–88.
- [22] van Horssen J, van Schaik P, Witte M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: a vicious circle in neurodegenerative disorders? *Neurosci Lett* 2019;710:132931.
- [23] James MO, Jahn SC, Zhong G, Smeltz MG, Hu Z, Stacpoole PW. Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1. *Pharmacol Ther* 2017;170:166–80.
- [24] Jha MK, Jeon S, Suk K. Glia as a link between neuroinflammation and neuropathic pain. *Immune Netw* 2012;12:41.
- [25] Jha MK, Jeon S, Suk K. Pyruvate dehydrogenase kinases in the nervous system: their principal functions in neuronal-glial metabolic interaction and neuro-metabolic disorders. *Curr Neuropharmacol* 2012;10: 393–403.
- [26] Jha MK, Lee IK, Suk K. Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase-lactic acid axis: linking metabolism and diverse neuropathophysiology. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;68:1–19.
- [27] Jha MK, Lee WH, Suk K. Functional polarization of neuroglia: implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol* 2016;103:1–16.
- [28] Jha MK, Rahman MH, Park DH, Kook H, Lee IK, Lee WH, Suk K. Pyruvate dehydrogenase kinase 2 and 4 gene deficiency attenuates nociceptive behaviors in a mouse model of acute inflammatory pain. *J Neurosci Res* 2016;94:837–49.
- [29] Jha MK, Song GJ, Lee MG, Jeoung NH, Go Y, Harris RA, Park DH, Kook H, Lee IK, Suk K. Metabolic connection of inflammatory pain: pivotal role of a pyruvate dehydrogenase kinase-pyruvate dehydrogenase-lactic acid Axis. *J Neurosci* 2015;35:14353–69.
- [30] Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *PAIN* 2014;154(suppl):S10–28.
- [31] Kanda H, Liu S, Iida T, Yi H, Huang W, Levitt RC, Lubarsky DA, Candiotti KA, Hao S. Inhibition of mitochondrial fission protein reduced mechanical allodynia and suppressed spinal mitochondrial superoxide induced by perineural human immunodeficiency virus gp120 in rats. *Anesth Analg* 2016;122:264–72.
- [32] Keilhoff G, Becker A, Kropf S, Schild L. Sciatic nerve ligation causes impairment of mitochondria associated with changes in distribution, respiration, and cardiolipin composition in related spinal cord neurons in rats. *Mol Cell Biochem* 2016;421:41–54.
- [33] Kim HY, Chung JM, Chung K. Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci Lett* 2008; 447:87–91.
- [34] Korotchkina LG, Patel MS. Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2001;276: 37223–9.
- [35] Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965–76.
- [36] Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *PAIN* 2005;115:71–83.
- [37] Lee HL, Lee KM, Son SJ, Hwang SH, Cho HJ. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport* 2004;15:2807–11.
- [38] Leverve XM, Fontaine E. Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 2001;52:221–9.
- [39] Lim TKY, Rone MB, Lee S, Antel JP, Zhang J. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in trauma-induced painful peripheral neuropathy. *Mol Pain* 2015;11:58.
- [40] Martínez-Palma L, Miquel E, Lagos-Rodríguez V, Barbeito L, Cassina A, Cassina P. Mitochondrial modulation by dichloroacetate reduces toxicity of aberrant glial cells and gliosis in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* 2019;16:203–15.
- [41] Meiser J, Krämer L, Sapcaru SC, Battello N, Ghelfi J, D'Herouel AF, Skupin A, Hiller K. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *J Biol Chem* 2016;291:3932–46.
- [42] Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, Maguire C, Gammer TL, Mackey JR, Fulton D, Abdulkarim B, McMurtry MS, Petruk KC. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* 2010;2:31ra34.
- [43] Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Bolatto C, Trias E, Gandelman M, Radi R, Barbeito L, Cassina P. Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2012;7:e34776.
- [44] Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodríguez-Bottero S, Logan A, Smith RAJ, Murphy MP, Barbeito L, Radi R, Cassina P. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2014;70:204–13.
- [45] Myers RR, Heckman HM, Rodríguez M. Reduced hyperalgesia in nerve-injured WLD mice: relationship to nerve fiber phagocytosis, axonal degeneration, and regeneration in normal mice. *Exp Neurol* 1996;141: 94–101.
- [46] Nam Y, Kim JHJH, Kim JHJH, Jha MK, Jung JY, Lee MG, Choi IS, Jang IS, Lim DG, Hwang SH, Cho HJ, Suk K. Reversible induction of pain hypersensitivity following optogenetic stimulation of spinal astrocytes. *Cell Rep* 2016;17:3049–61.
- [47] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press, 2011.
- [48] Old EA, Clark AK, Malcangio M. The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handbook of experimental pharmacology*. Vol. 227. Berlin: Springer, 2015. pp. 145–70.
- [49] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 2016;173:649–65.
- [50] Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002;383:401–9.
- [51] Raghavendra V, Tanga F, Deleo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:624–30.
- [52] Raghavendra V, Tanga FY, Deleo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci* 2004; 20:467–73.
- [53] Rose J, Brian C, Woods J, Pappa A, Panayiotidis MI, Powers R, Franco R. Mitochondrial dysfunction in glial cells: implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology* 2017;391:109–15.

- [54] Rueda CB, Llorente-Folch I, Traba J, Amigo I, Gonzalez-Sanchez P, Contreras L, Juaristi I, Martinez-Valero P, Pardo B, del Arco A, Satrustegui J. Glutamate excitotoxicity and Ca^{2+} -regulation of respiration: role of the Ca^{2+} activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2016;1857:1158–66.
- [55] Salabei JK, Gibb AA, Hill BG. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. *Nat Protoc* 2014;9:421–38.
- [56] Schmidtko A. Nitric oxide-mediated pain processing in the spinal cord. *Handb Exp Pharmacol* 2015;227:103–17.
- [57] Stacpoole PW. Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase complex/pyruvate dehydrogenase kinase (PDC/PDK) Axis in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017;109:1–14.
- [58] Stacpoole PW, Gilbert LR, Neiberger RE, Carney PR, Valenstein E, Theriaque DW, Shuster JJ. Evaluation of long-term treatment of children with congenital lactic acidosis with dichloroacetate. *Pediatrics* 2008;121:e1223–8.
- [59] Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, Cornett R, James MO. Pharmacokinetics, metabolism, and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab Rev* 1998;30:499–539.
- [60] Stacpoole PW, Martyniuk CJ, James MO. Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy. In: Fernyhough P, Calcutt NA, editors. *International Review of neurobiology*. Vol. 145. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press, 2019. pp. 211–38. doi: 10.1016/BS.IRN.2019.05.003.
- [61] Stuesse SL, Cruce WLR, Lovell JA, McBurney DL, Crisp T. Microglial proliferation in the spinal cord of aged rats with a sciatic nerve injury. *Neurosci Lett* 2000;287:121–4.
- [62] Sui B, Xu T, Liu J, Wei W, Zheng C, Guo B, Wang Y, Yang Y. Understanding the role of mitochondria in the pathogenesis of chronic pain. *Postgrad Med J* 2013;89:709–14.
- [63] Toyama S, Shimoyama N, Ishida Y, Koyasu T, Szeto HH, Shimoyama M. Characterization of acute and chronic neuropathies induced by oxaliplatin in mice and differential effects of a novel mitochondria-targeted antioxidant on the neuropathies. *Anesthesiology* 2014;120:459–73.
- [64] Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. *Exp Neurol* 2011;232:154–61.
- [65] Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *PAIN* 2005;114:149–59.