



Tesis de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Biología Celular
Facultad de Ciencias

***PUESTA A PUNTO DE MODELOS DE DOLOR
CRÓNICO Y ESTUDIO DEL EFECTO DEL
MODULADOR METABÓLICO Y MITOCONDRIAL
DICLOROACETATO***

Estudiante: Bach. Valentina Lagos Rodríguez

Tutora: Dra. Laura Martínez-Palma

Co-tutora: Dra. Natalia Lago

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Departamento de Histología
y Embriología, Facultad de Medicina. Montevideo-Uruguay. Febrero 2015.

Agradecimientos

A mi familia, en especial a mi madre, mi padre y mi hermano, por ayudarme a descubrir mi pasión y su apoyo incondicional en este camino.

Un especial agradecimiento a la Dra. Patricia Cassina por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza en mí y su incondicional apoyo; y a las Doctoras Laura Martínez-Palma y Natalia Lago por orientarme en este trabajo, por su infinita paciencia, apoyo y enseñanza del día a día.

A las Doctoras Silvia Olivera y Patricia Lagos por aceptar corregir este trabajo.

A mis compañeros y ya amigos del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular (NBCM), Ernesto, Laura y Seba de los cuales aprendo día a día mucho de todos ellos, gracias por su tiempo a la hora de enseñar y por su apoyo tanto profesional como personal.

A los amigos y compañeros que conocí en la Departamento de Histología y Embriología.

A la ANII por otorgarme una beca de Iniciación a la Investigación.

A mis hermanos de la vida y amigas del alma, Pili, Ro, Sofi P, Sofi C, Maruch, Nati, Virgi y Beti, por estar en las buenas y en las malas.

Por último, a mis grandes compañeros de camino, los amigos de la Facultad de Ciencias, sin ellos las cosas hubiesen costado el triple. A todos ellos mil gracias por las horas de estudio, charlas, comidas, por su compañía y por estar siempre.

MUCHAS GRACIAS!!

INDICE

1. RESUMEN.....	04
2. INTRODUCCIÓN.....	05
2.1. DOLOR: DEFINICIONES, IMPORTANCIA Y MECANISMOS BÁSICOS.....	05
2.2. MODELOS ANIMALES DE DOLOR.....	07
2.3. ROL DE LAS CÉLULAS GLIALES EN EL DOLOR.....	09
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1. ANIMALES.....	15
5.2. MODELOS DE DOLOR CRÓNICO.....	15
5.2.1. Modelo de dolor inflamatorio.....	15
5.2.2. Modelo de dolor neuropático	15
5.3. TRATAMIENTO.....	17
5.4. EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN.....	17
5.5. TEST DE COMPORTAMIENTO.....	18
5.5.1. Filamentos de Von Frey.....	18
5.5.2. Presentación del estímulo	19
5.5.3. Cálculo del umbral de dolor: Método “up-down” de Dixon.....	20
Descripción del método y registro de las respuestas.....	20
5.5.4. Curso temporal del test de comportamiento.....	24
5.6. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.....	25
5.6.1. Anestesia y perfusión.....	25
5.6.2. Obtención de secciones de tejido en crióstato.....	26
5.6.3. Histoquímica e inmunohistoquímica.....	27
5.6.3.1. Fundamento de la histoquímica de lectinas.....	27

5.6.3.2. Fundamento de la inmunohistoquímica.....	28
5.6.3.3. Protocolo.....	29
5.7. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	30
5.8. ANÁLISIS DE DATOS.....	32
5.8.1. Medidas de volumen del miembro posterior.....	32
5.8.2. Pruebas conductuales.....	32
5.8.3. Estudios histológicos.....	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1. PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO POR INYECCIÓN INTRAPLANTAR DE ACF.....	33
6.1.1. La administración intraplantar de ACF provocó tumefacción local....	33
6.1.2. La administración intraplantar de ACF provocó disminución del umbral de respuesta a estímulos mecánicos.....	33
6.1.3. La administración intraplantar unilateral de ACF no provocó una respuesta glial significativa.....	34
6.2. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DEL DCA EN EL DOLOR INFLAMATORIO.....	36
6.2.1. El tratamiento con DCA no modificó la respuesta a estímulos mecánicos en el modelo de dolor crónico.....	36
6.2.2. El tratamiento con DCA disminuyó la reactividad glial en el modelo de dolor crónico.....	37
6.3. PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO POR LESIÓN DEL NERVIO L5 Y ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DEL DCA.....	38
7. DISCUSIÓN.....	40
8. PERSPECTIVAS.....	45
9. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. RESUMEN

El dolor crónico es un problema clínico de gran impacto social y económico en la población mundial, con pocas estrategias farmacológicas eficaces. La reactividad glial en la médula espinal ha sido detectada en varios modelos de dolor crónico. Nuestro grupo ha reportado que la reactividad glial en la médula espinal que presentan los modelos animales de la enfermedad humana Esclerosis Lateral Amiotrófica se asocia a disfunción mitocondrial, y que la modulación metabólica por el fármaco dicloroacetato (DCA) redujo la reactividad glial y prolongó la supervivencia de los animales afectados. En el presente trabajo utilizamos dos modelos de dolor crónico en ratas macho adultas. Ensayamos un modelo de dolor neuropático por ligadura y corte del nervio espinal L5 y un modelo de dolor inflamatorio por inyección intraplantar unilateral de adyuvante completo de Freund (ACF). Los parámetros evaluados fueron la sensibilidad mecánica de los miembros posteriores utilizando los filamentos de von Frey y la presencia y distribución de marcadores de células gliales (inmunofluorescencia para la detección de GFAP en astrocitos, e histoquímica con lectina de tomate para marcar células microgliales) en el asta dorsal de la médula espinal. Comparamos la respuesta encontrada en el miembro lesionado con el contralateral, y evaluamos la eficacia del tratamiento con DCA (500 mg/L en el agua de beber) en la modificación de estos parámetros. En el modelo de dolor neuropático los estudios comportamentales mostraron una hipoalgesia ipsilateral a la cirugía, resultado que se discute en la sección correspondiente e inhibió de profundizar los estudios en este modelo. En el caso del modelo de inyección intraplantar de ACF observamos la alodinia mecánica ipsilateral esperada. Aunque el análisis de los marcadores gliales en la médula espinal, no reveló diferencias significativas entre el asta dorsal ipsi y contralateral a la inyección, en ambas astas dorsales se observó una reducción de esta señal en los animales tratados con DCA. Estos resultados sugieren que el DCA puede ofrecer una alternativa terapéutica para dolor crónico. El hecho de que el fármaco haya sido utilizado previamente en seres humanos resulta aún más interesante puesto que acorta la brecha entre los estudios preclínicos y clínicos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 DOLOR: DEFINICIONES, IMPORTANCIA Y MECANISMOS BÁSICOS

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 sensitiva y emocional desagradable asociada con una lesión tisular real o posible (www.iasp-pain.org).

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. En el estudio de la sensibilidad a los estímulos, la percepción de dolor, o **algesia**, puede presentar alteraciones en varias patologías. 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 (Basbaum y Jessell, 2000).

El dolor crónico es aquél que se prolonga durante más de tres a seis meses, o que persiste cuando ha desaparecido la causa y se considera que debiera haber remitido (CAPRCEIM; 2011). Aunque puede responder a múltiples causas relacionadas al envejecimiento (artritis), predisposición genética (migraña), asociación a otra enfermedad crónica (cáncer, enfermedades cardíacas), intervenciones quirúrgicas (por lesiones en nervios), o lesiones traumáticas (por ejemplo, dolor de espalda, dolor de cuello) (CAPRCEIM; 2011), el dolor crónico es reconocido como una entidad patológica o enfermedad en sí misma porque afecta la calidad de vida de los pacientes, con correlatos a nivel psicológico y cognitivo (Xu y col., 2012). Constituye además, un problema de gran impacto social y económico, debido a los costos generados en tratamientos médicos directos y pérdida en la productividad de los pacientes (Dworkin y col., 2010). El dolor, y la intensidad con que se percibe son subjetivos, y están influenciados por factores biológicos, sociales y emocionales. Esta naturaleza individual y subjetiva del dolor es uno de los factores que dificulta su definición, evaluación y tratamiento clínico (Basbaum y

Jessell, 2000; Finnerup y col., 2013). Más aún, la poca medicación disponible para su tratamiento se asocia a una serie de efectos colaterales indeseables (Montes y Retamoso, 2012).

En relación a los mecanismos subyacentes al dolor, su percepción depende de receptores (**nociceptores**) y vías neurales específicas. La detección del estímulo nocivo, denominada **nocicepción**, está a cargo de los nociceptores, que son las terminaciones libres de la prolongación periférica de un grupo de neuronas sensoriales (neuronas aferentes de primer orden) cuyo cuerpo se localiza en los ganglios de las raíces dorsales medulares y en los ganglios trigeminales. Estas neuronas pseudomonopolares son las encargadas de la transducción, conducción y transmisión del estímulo nocivo. Sus axones son de dos tipos: 1) fibras A δ , responsables del primer dolor (agudo) que aparece frente a un estímulo nociceptivo, o 2) fibras C, responsables del dolor más sordo y duradero que le sigue (Purves, 2008). Las prolongaciones centrales de las neuronas nociceptoras ganglionares son las fibras aferentes nociceptivas, que terminan en el núcleo sensitivo trigeminal del tronco encefálico o en el asta dorsal de la médula espinal, donde hacen sinapsis con neuronas de proyección localizadas en las láminas I y II. A partir de ahí, la información continúa al tronco cerebral y en última instancia, a la corteza cerebral, donde se genera la percepción del dolor. El dolor es el producto del procesamiento de centros superiores del cerebro (Purves, 2008).

Entre los mecanismos neurales responsables de la hipersensibilidad al dolor, tenemos en primer lugar, la **sensibilización periférica** causada por mediadores inflamatorios en las terminales periféricas de las neuronas sensoriales (Sandkühler, 2009). El proceso inflamatorio, provocado por el reclutamiento de células inmunocompetentes y la generación de radicales libres, lleva a la liberación de al menos tres importantes mediadores del dolor: el factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor, TNF), la interleuquina 1 β (IL-1 β), y el factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF). Todos estos factores son capaces de activar y sensibilizar a las neuronas nociceptivas y de ese modo estarían contribuyendo al dolor continuo e hiperalgesia. Esto ha sido fundamentado por observaciones electrofisiológicas que demuestran que la administración aguda de todos estos agentes puede sensibilizar a las aferentes nociceptivas a los estímulos térmicos y químicos (McMahon y col.,

2005). En segundo lugar, se describe un mecanismo de **sensibilización central** provocado por un aumento en la eficacia sináptica a nivel de la médula espinal, consecuencia de la plasticidad química, estructural y funcional de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Sandkühler, 2009).

Dos ejemplos de dolor crónico ampliamente estudiados son el dolor inflamatorio y el neuropático. El **dolor inflamatorio o nociceptivo**, generado tras lesiones o daños de tejidos, como fractura ósea, neuropatía periférica y artrosis, entre otras, es uno de los síntomas clínicos más comunes. La alodinia mecánica e hipersensibilidad térmica que genera estarían relacionadas con mediadores inflamatorios, y otras señales químicas liberadas desde los tejidos lesionados, que alterarían el umbral de los nociceptores y la excitabilidad de las neuronas de la médula (Kidd y Urban, 2001; Xu y col., 2013).

En cuanto al **dolor neuropático**, se define como un dolor causado por una lesión directa o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial, tanto central como periférico (Treede y col., 2008). Las formas más comunes de dolor neuropático incluyen las radiculopatías, la neuralgia del trigémino, la neuropatía diabética dolorosa, la neuralgia postherpética, el dolor neuropático inducido por radiación y quimioterapia, el dolor postaccidente cardiovascular y el llamado síndrome doloroso regional complejo, entre otros. El dolor neuropático puede presentarse como una sensación quemante, persistente y/o lancinante, dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia (Baron y col., 2010).

2.2 MODELOS ANIMALES DE DOLOR

El ritmo de avance en la comprensión del dolor se ha acelerado enormemente por el desarrollo de modelos animales que reflejan algún elemento de los síndromes clínicos del dolor. Existen numerosos modelos animales (la mayoría en rata y ratón) para el estudio del dolor persistente o crónico. Se han desarrollado modelos de dolor superficial, articular, muscular, postquirúrgico, orofacial, tumoral, etc. Los mecanismos patológicos involucrados son fundamentalmente de tipo inflamatorio y neuropático, o en algunos casos involucran ambos (NRCCRAPLA-A, 2009).

En los **modelos de dolor inflamatorio**, el dolor es inducido mediante inyección (frecuentemente en uno de los miembros posteriores) de diversos agentes que provocan inflamación en el sitio de inyección, tales como formalina,

carragenina, zymosan, etc, siendo el adyuvante completo de Freund (ACF) uno de los más empleados. La *Mycobacterium tuberculosis* contenida en el ACF produce una respuesta inflamatoria a través del sistema inmune adaptativo (Freud, 1947). El modelo de inyección intraplantar de ACF fue descrito por Stein y col. (1988) buscando un modelo alternativo al de la poliartritis por inyección de este inmunógeno que no provocara alteraciones sistémicas tan severas.

En el caso de los **modelos de dolor neuropático**, las estrategias se subdividen en: 1) aquellas en que se induce a nivel central, por trauma, injuria química o inflamación en la médula espinal y 2) las que se induce a nivel periférico, que consisten en la ligadura, constricción o transección parcial de nervios (NRCCRAPLA-A, 2009). 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 (Gómez-Barrios y Tortorici, 2009). Entre los modelos más empleados para generar un trauma mecánico en los nervios figuran la constricción crónica del nervio (CCN) (Bennett y Xie, 1988), la ligadura parcial del nervio ciático (LPN) (Seltzer y col., 1990), la ligadura del nervio espinal (LNS) (Kim y Chung, 1992) y la ligadura neural por omisión (LNO) (Decosterd y Woolf, 2000). Estos modelos producen signos conductuales característicos del dolor neuropático, que también son observados en los pacientes con este tipo de patología (Gómez-Barrios y Tortorici, 2009). En el caso del modelo de LNS se genera un daño en los nervios espinales L5 y L6 (antes de su entrada al nervio ciático), por medio de una ligadura muy ajustada que provoca su sección transversal (Kim y Chung, 1990), lo que reduce en más de un 50% la inervación de los miembros posteriores, afectando incluso a los ganglios dorsales vecinos. Este modelo es significativamente más invasivo que el de CCN e induce conductas nociceptivas por un tiempo más prolongado (Gómez-Barrios y Tortorici, 2009). Típicamente en todos estos tipos de modelos se estudian la hiperalgesia y la alodinia inducidas mediante la aplicación de estímulos térmicos o mecánicos, que son los más utilizados para determinar el grado de nocicepción en los animales de experimentación (NRCCRAPLA-A, 2009). El desarrollo de estos modelos ha permitido dilucidar los mecanismos subyacentes de esta patología,

el diseño de estrategias terapéuticas y el diagnóstico acertado de la enfermedad (Gómez-Barrios y Tortorici, 2009).

2.3 ROL DE LAS CÉLULAS GLIALES EN EL DOLOR

Durante mucho tiempo se ha reconocido que una variedad de células no neuronales podría desempeñar un papel importante en iniciar y modular la actividad de los nociceptores aferentes primarios a través de la liberación de distintos mediadores. Una fuente de tales mediadores son las células del sistema inmune reclutadas en los sitios de lesión periférica e inflamación (Marchand y col., 2005; Skaper y col., 2013), pero más recientemente ha sido reconocida la influencia de las células gliales del sistema nervioso central (SNC), que incluyen algunas células del sistema inmune, tales como microglía, pero también los astrocitos y oligodendrocitos, en el procesamiento y modulación del dolor (McMahon y Malcangio, 2009). El término glía se refiere a un conjunto diverso de células especializadas que se encuentran tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) (células de Schwann, glia satélite, glia perineural) como en el SNC (astrocitos, oligodendrocitos, microglia) (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Las células gliales, de particular importancia en nuestro caso los astrocitos y microglías, constituyen la población más numerosa del SNC, superando ampliamente a las neuronas. Los astrocitos ofrecen sostén estructural, metabólico y trófico a las neuronas además de participar en su actividad sináptica (Parpura y Verkhratsky, 2012). Expresan un gran número de receptores de neurotransmisores y ellos mismos pueden liberar neurotransmisores como el glutamato, D-serina o adenosina trifosfato (ATP), en respuesta a la elevación de la concentración de calcio intracelular. Los astrocitos se encuentran comunicados entre sí a través de uniones gap, que los acopla metabólicamente, formando redes por las que se propagan y redistribuyen los niveles intracelulares de calcio y de otros iones. Además, estas células responden al ATP a través de la activación del receptor purinérgico P2Y con generación de Inositol trifosfato (IP3) y elevación de calcio intracelular. Esto puede modular la neurotransmisión y la plasticidad sináptica (Haydon, 2001). Por su parte, las células microgliales incluyen los macrófagos residentes del SNC, que en condiciones normales desempeñan la vigilancia inmune del sistema nervioso exhibiendo procesos ramificados y móviles

(Lobsiger y Cleveland, 2007) y expresan receptores para los componentes del complemento, receptor Fc para IgG y bajos niveles de moléculas inmunes de superficie celular (McMahon y Malcangio, 2009).

La reactividad glial es una respuesta que ocurre en situaciones de injuria aguda o crónica al SNC y/o tejidos periféricos, incluyendo el dolor crónico (Ji y col., 2013) y las enfermedades neurodegenerativas, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Rowland y Shneider, 2001; Barbeito y col., 2004). En la población astrocitaria esta reactividad o astrogliosis se caracteriza por aumento de la proliferación, cambios morfológicos (hipertrofia y desarrollo de prolongaciones más gruesas), incremento o redistribución de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y producción de diversos factores de crecimiento y citoquinas (Wang y Bordey, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010). También ocurre activación de la microglía; sus cuerpos celulares aumentan de tamaño, las prolongaciones se vuelven más gruesas y las ramas distales se ramifican menos; estos cambios morfológicos son acompañados por un incremento de la actividad fagocítica y migratoria y la expresión génica de muchos receptores y citoquinas (Wen y col., 2011; Zhuo y col., 2011).

En diversos modelos de dolor, incluyendo los inducidos periféricamente, se observa 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. Tanto astrocitos como microglías participan activamente en la iniciación y mantenimiento de la facilitación del dolor inducido por la inflamación y el daño, ya sea en los tejidos periféricos, los nervios periféricos, los nervios espinales o directamente en la médula espinal (Raghavendra y col., 2004; Tiwari y col., 2014). Dado que el dolor se transmite únicamente por la neurotransmisión en los circuitos neuronales, las células gliales reactivas deben interactuar con las neuronas para modular la sensibilidad al dolor (Ji y col., 2013). Luego de una lesión, las descargas espontáneas de las aferentes primarias resulta en la liberación de ATP, quimiocinas (CCL2, CCL21, CX3CL1), metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9), neuregulín 1 (NRG1), y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CRGP) dando lugar a la activación de la microglía en el asta dorsal de la médula espinal. La microglia espinal expresa receptores para ATP (P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12), para quimiocinas (CX3CR1, CCR2) y para NRG1 (ErB2). La activación de estos

receptores induce la fosforilación de p38 y ERK (fase temprana) en microglía, que conduce 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 (Ji y col., 2013).

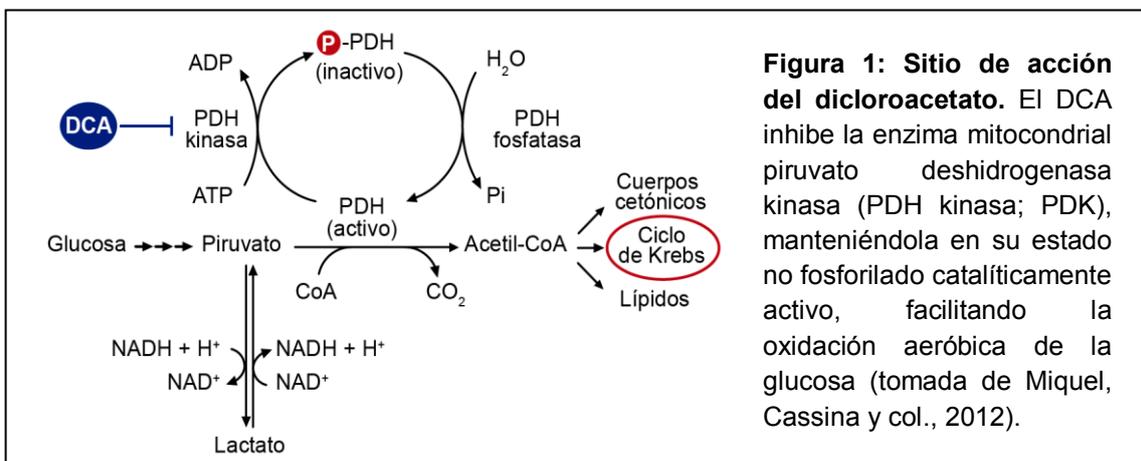
Los astrocitos pueden ser activados tanto por mediadores microgliales (TNF- α y IL-18), como por mediadores astrocíticos (MMP-2 y bFGF), que generan la fosforilación de JNK y ERK-P en astrocitos. Esta activación de los astrocitos resulta en la posterior producción y liberación de quimioquinas y citoquinas (CCL2, IL-1 β). Los astrocitos también liberan ATP y glutamato después de la activación de sus hemicanales (Cx43 y PNX1) (Ji y col., 2013). Además, la regulación a la baja de los transportadores GLT1 de astrocitos provoca la disminución en la captación astrocítica de glutamato. La liberación de mediadores astrocitarios (CCL2, IL-1b y glutamato) puede provocar sensibilización central mediada por receptores NMDA, y mantener aún más la activación microglial. 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 (Ji y col., 2013). Los efectos de estas células gliales pueden surgir a distancia, es decir, en zonas del SNC bastante alejadas del foco de la lesión o enfermedad. El sistema nervioso es capaz de iniciar señales que alteran la función de estas células gliales, y al ser reclutadas, éstas a su vez regulan la función neuronal. Esta idea se ha arraigado en el campo del estudio del dolor produciendo un notable incremento en el interés en la investigación en este fenómeno (McMahon y Malcangio, 2009).

De todo lo anterior se desprende que las relaciones neurona-glía y glía-glía participan en la generación y mantenimiento del dolor crónico y, aunque sus múltiples mecanismos distan de estar totalmente aclarados, las estrategias dirigidas a modificar el fenotipo glial podrían resultar efectivas para su tratamiento. En este sentido, nuestro grupo de investigación, liderado por la Dra. Patricia Cassina, ha demostrado que en modelos de ELA, los astrocitos reactivos presentan una remodelación metabólica que incluye disminución de la actividad respiratoria mitocondrial asociada a una capacidad tóxica para las neuronas, los que reducen la supervivencia de motoneuronas en cocultivo (Cassina y col., 2008).

Teniendo en cuenta la disfunción mitocondrial observada en la ELA, Miquel, Cassina y colaboradores ensayaron, como estrategia terapéutica alternativa, la estimulación de la actividad mitocondrial a través de la facilitación del aporte de sustratos a la cadena respiratoria (Miquel, Cassina y col., 2012).

El metabolismo de la glucosa puede terminar con la glucólisis en el citosol (convirtiendo piruvato a lactato) o continuar con la oxidación del piruvato en la mitocondria. Esto depende del control del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH), localizado en la matriz mitocondrial, que media la formación de acetil-coenzima A a partir de piruvato. El acetilcoenzima A es sustrato para el ciclo de Krebs, el cual alimenta la cadena de transporte de electrones responsable de la síntesis de ATP y el consumo de oxígeno. La actividad de la PDH es inhibida por fosforilación por la PDH kinasa (PDK) (Patel y Roche, 1990). El DCA es un organohaluro que ha sido utilizado para el tratamiento de mitocondriopatías en humanos debido a su capacidad para estimular el metabolismo mitocondrial, ya que inhibe la PDK, manteniéndola en su estado no fosforilado catalíticamente activo, facilitando la oxidación aeróbica de la glucosa, estimulando de esta forma la actividad mitocondrial (Stacpoole y col., 2006). En la figura 1 se esquematiza el sitio de acción del fármaco.

En el sistema nervioso central, el DCA estimula la oxidación de glucosa y lactato a CO₂ y reduce la liberación de lactato principalmente en astrocitos, porque son las células que habitualmente realizan glucólisis anaerobia. Por el contrario casi no tendría efectos sobre las neuronas debido a la



compartimentación del metabolismo de la glucosa entre neuronas y astrocitos

(Itoh, 2003). La fracción de la PDH total que se encuentra en la forma fosforilada, inactiva, es usualmente mayor en los astrocitos que en las neuronas, situación que favorece la exportación de lactato desde los astrocitos hacia las neuronas, lo cual puede ser modulado por el DCA (Itoh, 2003). Aunque los mecanismos por los cuales la reversión de la remodelación metabólica reduce la reactividad glial no han sido esclarecidos, el tratamiento con DCA reduce la reactividad glial en la médula espinal y mejora los síntomas motores en ratones portadores del gen de la SODG93A, utilizados como modelo animal de ELA (Miquel, Cassina y col., 2012).

Dado que en los modelos de dolor crónico se detecta reactividad glial en el asta dorsal medular, sería de interés evaluar la eficacia de tratamientos dirigidos a modular la reactividad glial en estos modelos.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Tomando en cuenta los antecedentes expuestos, en la presente tesis trabajamos para comprobar la hipótesis de que el tratamiento oral con DCA sería capaz de reducir la gliosis en la médula espinal y disminuir la alodinia que caracteriza a los modelos de dolor crónico.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo fue poner a punto dos modelos de dolor crónico, uno inflamatorio y otro neuropático, en los cuales estudiar el efecto de la modulación metabólica con DCA sobre la reactividad glial y la alodinia mecánica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Establecer y caracterizar conductual e histológicamente de dos modelos de dolor crónico descritos en la literatura, uno inflamatorio por inyección intraplantar de ACF y uno neuropático por lesión de la raíz L5.
2. Analizar los efectos del DCA sobre la alodinia mecánica en los modelos establecidos.
3. Evaluar el efecto del DCA sobre la reactividad glial que aparece en la médula espinal de los animales sometidos a dolor crónico.
4. Establecer la relación entre los cambios en el comportamiento de alodinia con los cambios en la gliosis reactiva.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Se utilizaron machos adultos de ratas Wistar, de entre 200 y 250 g de peso al inicio de los experimentos, los cuales fueron adquiridos y mantenidos en la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina en un ciclo luz-oscuridad (12h/12h), en dase al protocolo de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) (protocolo experimental número 071140-000375-13).

5.2 MODELOS DE DOLOR CRÓNICO

5.2.1 Modelo de dolor inflamatorio

Un grupo de animales (n=6) fueron inmovilizadas con un paño de algodón y exponiendo el miembro posterior derecho. Se inyectaron 50µl del agente inmunógeno adyuvante completo de Freund (ACF; 1µg/µl; Sigma) entre las almohadillas plantares (ver sitio marcado en la figura 3). El ACF provoca inflamación e hiperalgesia local desde el primer día tras la inyección y durante 15 días. Dado que el objetivo del modelo es obtener una respuesta nociceptiva aumentada, no se utilizan métodos analgésicos es este procedimiento. No obstante, este modelo es ampliamente utilizado en la literatura científica y el dolor generado, no resulta paralizante para el animal (Raghavendra y col., 2004; Clark y col., 2007).

Soluciones:

- ACF (1µg/µl) Sigma

Materiales:

- Jeringa con aguja de 27G

5.2.2 Modelo de dolor neuropático

Otro grupo de animales (n=6) fueron destinados al modelo de dolor neuropático. Previo a la cirugía fueron anestesiados con una solución de

Ketamina (90 mg/kg) - Xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Con el animal en decúbito ventral se realizó la asepsia (etanol 70°) y rasurado de la piel de la región dorsal lumbar derecha. Se trazó una incisión anteroposterior de 1cm de longitud en la zona lateral a la columna, primero en la piel, y luego en el músculo para localizar el inicio del nervio ciático. Este último está compuesto por los nervios espinales lumbares L4, L5 y L6, los cuales se van uniendo a medida que emergen de sus respectivos agujeros de conjugación. Siguiendo el trayecto del nervio ciático desde caudal a cefálico, se localizaron L6, L5 y L4. Se expuso y se ligó L5 con hilo de sutura y se cortó distal a la ligadura (ver el esquema de la figura 2). Para terminar la intervención quirúrgica se suturó el músculo y la piel, se limpió la zona con iodofón y se dejó recuperar a los animales durante 4 días antes de realizar los test sensoriales (Chaplan y col., 1994).

En ambos modelos el miembro contralateral al que se realizó el procedimiento se utilizó como el control absoluto en los experimentos.

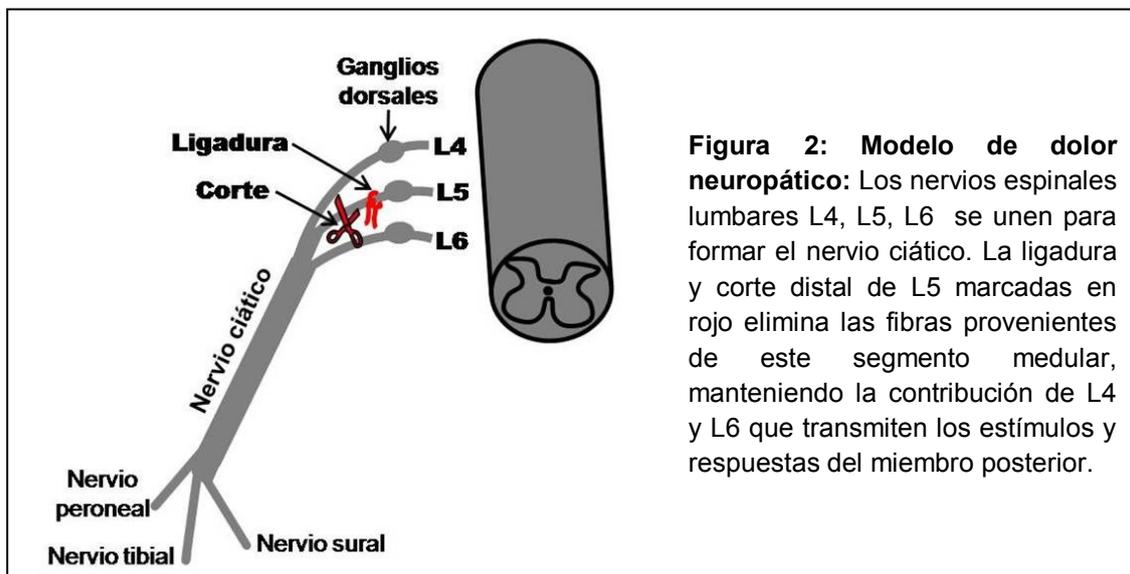


Figura 2: Modelo de dolor neuropático: Los nervios espinales lumbares L4, L5, L6 se unen para formar el nervio ciático. La ligadura y corte distal de L5 marcadas en rojo elimina las fibras provenientes de este segmento medular, manteniendo la contribución de L4 y L6 que transmiten los estímulos y respuestas del miembro posterior.

Soluciones:

- Ketamina (90 mg/kg) - Xilazina (10 mg/ kg)
- Etanol 70°
- Iodofón

Materiales:

- Jeringa de 1ml con aguja de 27G
- Material de disección: tijeras, pinzas, bisturí e hilo de sutura
- Algodón

5.3 TRATAMIENTO

Tanto en el modelo 1 como en el 2, los animales fueron subdivididos al azar en dos grupos (n=3 por grupo), uno de los cuales recibió en el agua de beber DCA (500 mg/L, Sigma) y el otro recibió solo agua siendo así el grupo control. Se preparó una solución fresca de DCA dos veces por semana y se controló el volumen total consumido para asegurar una dosis constante, comprobando también que no hubiera diferencias en la ingesta de agua entre el grupo control y el tratado con DCA (Miquel, Cassina y col., 2012).

El tratamiento se extendió desde el día de la inyección o la cirugía hasta su sacrificio en el día 18 post-inyección para el modelo 1 y el día 25 post-cirugía en el caso del modelo 2.

5.4 EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Se utilizó un calibre con el cual se realizaron medidas de las patas posteriores de los animales inmovilizados en forma similar que para la inyección de ACF. Tomando el momento de la inyección de ACF como día 0, se realizaron medidas a lo largo del experimento en los días: -1 (basal: 1 día previo a la inyección), 1, 3, 8 y 13. En cada pata se midió, como se muestra en la figura 3:

a) la longitud, distancia entre la articulación tibiotarsal y las almohadillas anteriores, b) ancho, medido a nivel de las almohadillas medias, y c) espesor, medido al mismo nivel que el ancho. Estos datos se utilizaron para calcular el volumen de un prisma rectangular que se tomó como representativo del volumen de la región a evaluar.



Figura 3: Región plantar de pata posterior de un animal mostrando el sitio de medición de los parámetros longitud y ancho. La flecha roja indica el sitio de inyección.

5.5 TEST DE COMPORTAMIENTO

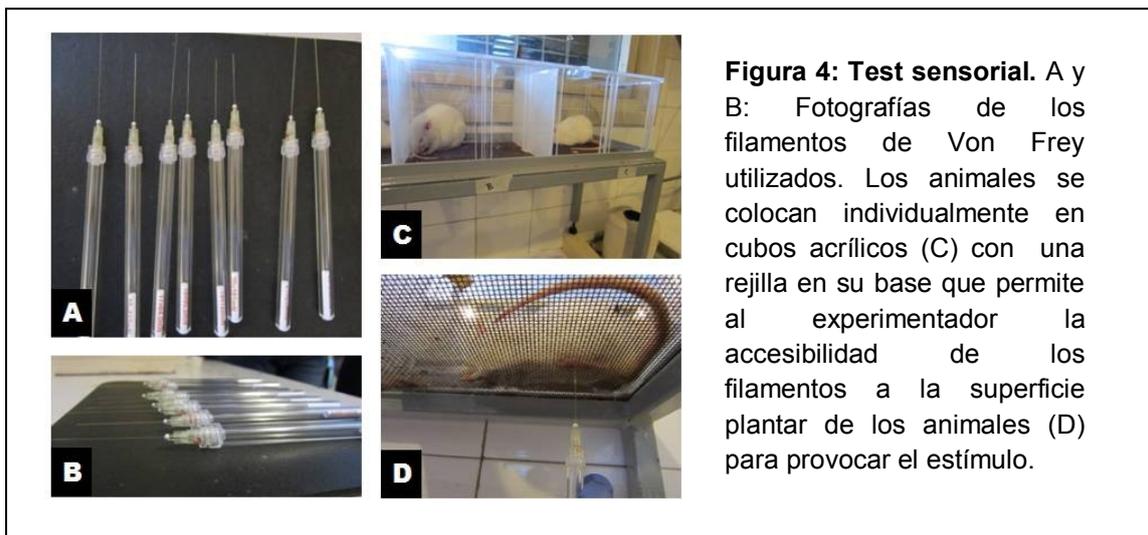
5.5.1 Filamentos de Von Frey.

Para evaluar la sensibilidad mecánica se utilizaron los filamentos calibrados de Von Frey. Éstos son fibras de nylon flexibles de diferentes diámetros (ver la figura 4, A y B) que ejercen niveles de fuerza definidos.

Los filamentos llevan su nombre en honor a Max von Frey, quien hace más de un siglo, precisamente en 1896, describió por primera vez el uso de pelos de diferente rigidez para el examen de la sensibilidad táctil en el ser humano (von Frey, 1896). Este método se basa en el principio físico de que una columna elástica, al someterse a compresión, se deformará elásticamente a una fuerza específica, dependiente de la longitud, el diámetro y el módulo del material (Ley de pandeo de Euler). Una vez comprimida, la fuerza impartida por la columna es bastante constante, independientemente del grado de pandeo. Por tanto, los filamentos se pueden utilizar para aplicar una gama de fuerzas a la piel de un sujeto, a fin de encontrar la fuerza a la que el sujeto reacciona por la sensación dolorosa. Originalmente, von Frey utilizó pelos humanos y cerdas de animales con diámetros y longitudes diferentes. Los pelos se fijaban en ángulo recto a un extremo de una varilla de madera fina. Madera y pelos más tarde fueron sustituidos por acrílico y fibras sintéticas. Hoy en día, los filamentos de von Frey son ampliamente utilizados en la evaluación clínica de pacientes y en investigación en modelos animales de dolor (Fruhstorfer y col., 2001). En nuestro caso utilizamos una serie de 9 filamentos, del N° 15 al 23, y cuyas fuerzas en gramos se presenta en la tabla 1.

Tabla 1: Fuerza ejercida por los filamentos de Von Frey de la serie utilizada.

Nº de Filamento	Fuerza (gramos)
15	3,26
16	4,62
17	6,52
18	9,23
19	13
20	18,5
21	26,1
22	36,9
23	52,2



5.5.2 Presentación del estímulo

La prueba se realizó sólo durante la parte del día del ciclo circadiano (06:00-18:00 h). Para llevar a cabo el test de comportamiento, los animales se colocaron de forma individual en cubículos acrílicos con una rejilla en su base como se muestra en la figura 4 (C y D), Esta rejilla permite la introducción de los filamentos por parte del experimentador para provocar el estímulo. Previo a la realización del test, los animales se dejaron aclimatar durante 30 minutos dentro de los cubículos acrílicos. Durante este período y durante la realización del test la habitación se mantuvo con temperatura y sonoridad controlada para evitar la interferencia de otros estímulos en los experimentos.

Luego de la aclimatación, los filamentos calibrados de Von Frey fueron aplicados en el centro de la planta de cada miembro posterior de forma perpendicular a la superficie con suficiente fuerza para causar un ligero pandeo. El estímulo fue mantenido durante 8 segundos y se observó si en ese período el animal presentaba un cambio de comportamiento en respuesta al mismo. La retirada brusca de la pata, lamida de la pata y/o vocalización se tomaron como respuestas positivas. Las retiradas de la pata por simple locomoción se tomaron como respuestas ambiguas, en estos casos se repitió el estímulo presentado luego de unos segundos de descanso (Chaplan y col., 1994).

5.5.3 Cálculo del umbral de dolor: Método “up-down” de Dixon

El test tiene la finalidad de encontrar un **umbral de respuesta** frente a los estímulos presentados, para poder comparar un sector que presentó una lesión o inflamación con un sector no lesionado, o evaluar si existen cambios con el tiempo, o ante distintos tratamientos. Para calcular este umbral utilizamos el método “up-down” de Dixon (1980). El test consistió en aplicar series de estímulos de fuerza consecutivamente creciente o decreciente (up-down) dependiendo de la respuesta al estímulo inicial que corresponde al filamento del medio de la serie. Entre estímulos consecutivos se dejan intervalos de 30 segundos, lo que permite la resolución evidente de las respuestas de comportamiento a los estímulos anteriores. Las series se repitieron como se describe a continuación y el “**umbral de dolor**” para cada miembro posterior analizado se obtuvo calculando el umbral de respuesta de 50 % o LD 50% (así denominado por extensión de la dosis letal 50 utilizada para estudios farmacológicos), que **corresponde al estímulo mínimo requerido para provocar el 50% de las respuestas positivas** (Chaplan y col., 1994).

Descripción del método y registro de las respuestas:

El estímulo inicial es siempre el filamento del **medio** de la serie, en nuestro caso el filamento N° 19 (ver la tabla 1) y los estímulos siguientes se aplicarán en forma **consecutiva**. El filamento que se utiliza en cada estímulo siguiente será el inmediato en la serie, de mayor o menor fuerza dependiendo de la respuesta previa: en ausencia de respuesta positiva frente a un estímulo, se presenta el filamento de mayor fuerza inmediato en la serie; si la respuesta es positiva, se presenta el filamento de menor fuerza más cercano en la serie. Las respuestas a los estímulos presentados se registran en una planilla, usando por convención, **X** para las respuestas positivas y **0** para cuando no responde. Se utiliza una planilla para cada miembro a testear. La planilla consta de 9 columnas, cada una correspondiente a un filamento y 5 filas que corresponden a las series de estímulos que se repiten.

Las respuestas iniciales se registran en la primera fila, en su intersección con la columna del correspondiente filamento. La serie finaliza cuando el perfil de respuesta cambia, (si el animal venía respondiendo positivamente a los filamentos decrecientes y al siguiente no responde, o en el caso contrario, en

que el animal no responde a filamentos de peso creciente y en el siguiente responde). Luego de este último registro, se comienza una nueva serie con el filamento inmediatamente consecutivo previo al que generó el cambio del patrón de respuesta; las observaciones se anotan en la segunda fila, y a partir de aquí se registran las respuestas en una nueva fila, hasta llegar a la quinta en donde termina el test. La figura 5 A muestra un ejemplo de estos registros.

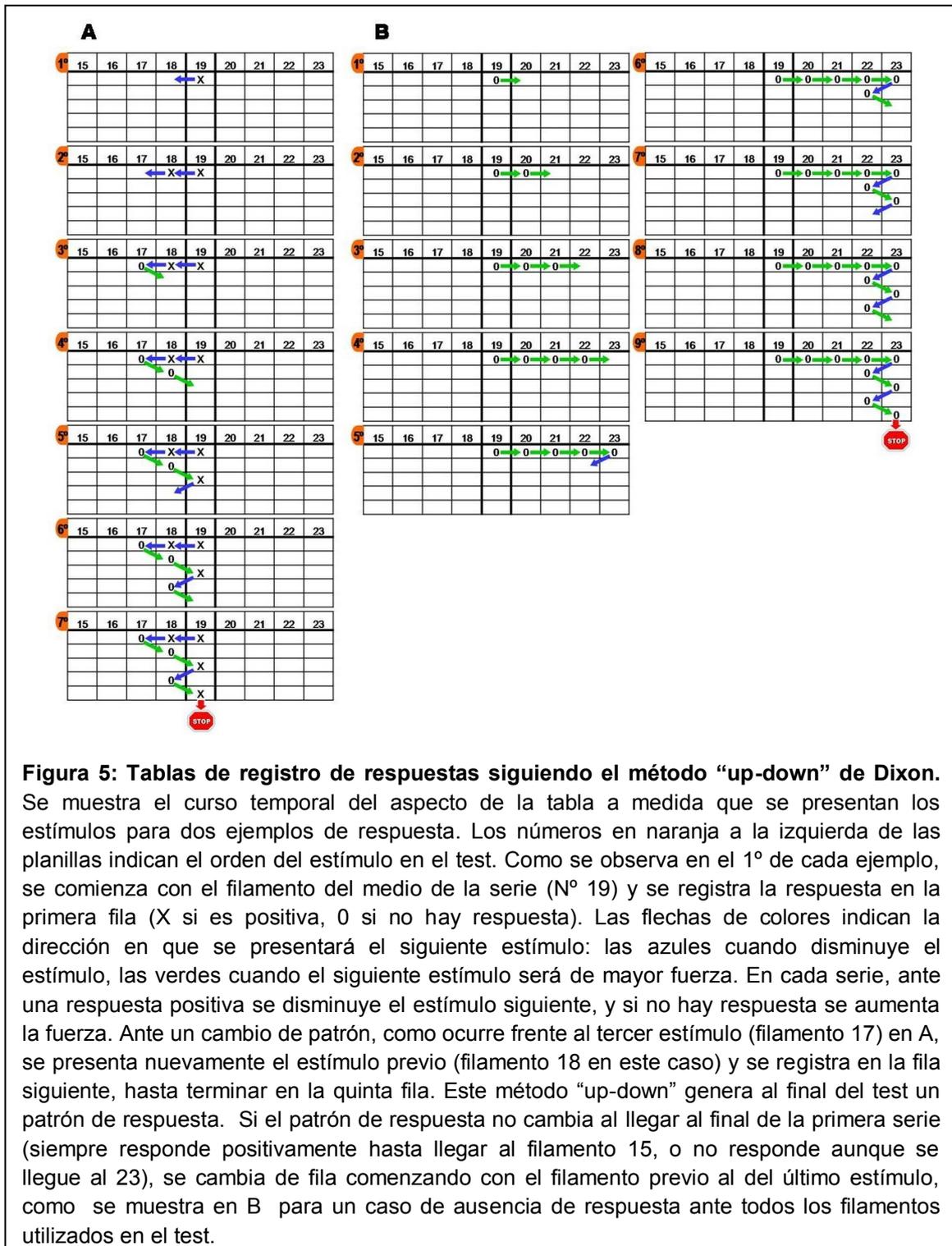


Figura 5: Tablas de registro de respuestas siguiendo el método “up-down” de Dixon. Se muestra el curso temporal del aspecto de la tabla a medida que se presentan los estímulos para dos ejemplos de respuesta. Los números en naranja a la izquierda de las planillas indican el orden del estímulo en el test. Como se observa en el 1^o de cada ejemplo, se comienza con el filamento del medio de la serie (N^o 19) y se registra la respuesta en la primera fila (X si es positiva, 0 si no hay respuesta). Las flechas de colores indican la dirección en que se presentará el siguiente estímulo: las azules cuando disminuye el estímulo, las verdes cuando el siguiente estímulo será de mayor fuerza. En cada serie, ante una respuesta positiva se disminuye el estímulo siguiente, y si no hay respuesta se aumenta la fuerza. Ante un cambio de patrón, como ocurre frente al tercer estímulo (filamento 17) en A, se presenta nuevamente el estímulo previo (filamento 18 en este caso) y se registra en la fila siguiente, hasta terminar en la quinta fila. Este método “up-down” genera al final del test un patrón de respuesta. Si el patrón de respuesta no cambia al llegar al final de la primera serie (siempre responde positivamente hasta llegar al filamento 15, o no responde aunque se llegue al 23), se cambia de fila comenzando con el filamento previo al del último estímulo, como se muestra en B para un caso de ausencia de respuesta ante todos los filamentos utilizados en el test.

En el caso de que la respuesta siempre sea igual (solo **0** o solo **X**) se completa la primera fila y luego se va pasando a las siguientes como se muestra en la figura 5B.

Este método implica que el número de veces que se estimula a la pata de un animal, está determinado por su propio **patrón de respuestas**, y puede variar con respecto al número de estímulos al que se sometió otro animal, e incluso al de la otra pata del mismo individuo.

Al alinear los **0** y **X** de la planilla, se obtiene lo que denominamos el **patrón de respuestas** para cada miembro analizado (figura 6A, B). Basado en este patrón y el peso del último filamento ejercido, se calculará el umbral de respuesta del 50% o LD 50% con la siguiente fórmula:

$$LD\ 50\% = 10^{(Xf+k\delta)}$$

- δ es una constante para todos los animales estudiados que corresponde al promedio de las diferencias logarítmicas de los pesos en gramos de los filamentos utilizadas en el test (figura 6D) (Chaplan y col., 1994; Dixon, 1980). Los factores Xf y K dependen de la respuesta individual al test; cada miembro posterior de cada animal estudiado va a tener sus correspondientes Xf y K ,

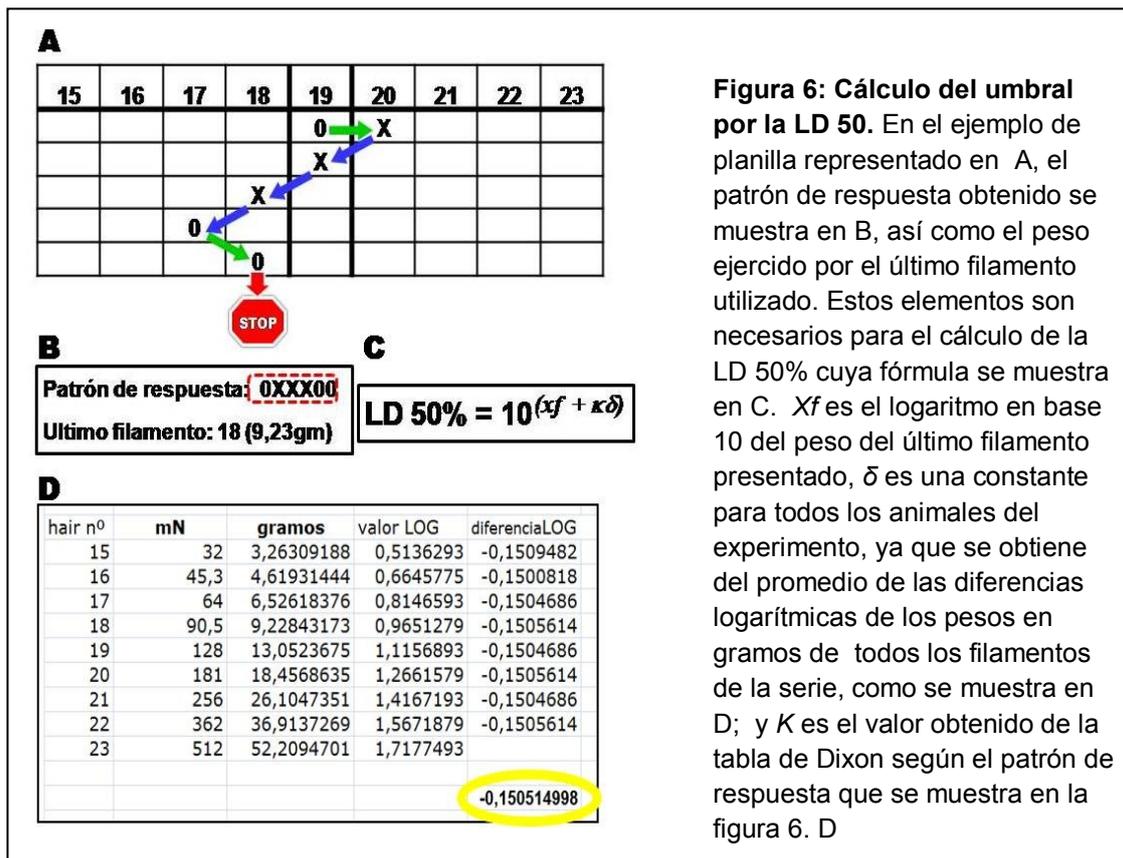


Figura 6: Cálculo del umbral por la LD 50. En el ejemplo de planilla representado en A, el patrón de respuesta obtenido se muestra en B, así como el peso ejercido por el último filamento utilizado. Estos elementos son necesarios para el cálculo de la LD 50% cuya fórmula se muestra en C. Xf es el logaritmo en base 10 del peso del último filamento presentado, δ es una constante para todos los animales del experimento, ya que se obtiene del promedio de las diferencias logarítmicas de los pesos en gramos de todos los filamentos de la serie, como se muestra en D; y K es el valor obtenido de la tabla de Dixon según el patrón de respuesta que se muestra en la figura 6. D

- Xf es el logaritmo en base 10 del peso del último filamento utilizado.
- K es un valor que se obtiene de la tabla de Dixon (Figura 7) según el patrón de respuesta. Para obtener el valor de K , en primer lugar, se divide el patrón de respuestas obtenido en dos partes. Dependiendo de si se comenzó por caracteres **0** o caracteres **X**, la primer parte del patrón se busca en la fila superior (**0**) o inferior (**X**) de la tabla; la cantidad de caracteres de esta parte del patrón depende de cuantas veces se repitió la misma respuesta que al filamento inicial en la primer serie. La secuencia restante se busca en los

Table 7 Maximum likelihood estimates of LD₅₀^a

N	Second part of series	k for test series whose first part is				Standard error of LD ₅₀	
		0	00	000	0000		
2	X	-0.500	-0.388	-0.378	-0.377	0	0.88 σ
3	XO	0.842	0.890	0.894	0.894	OX	0.76 σ
	XX	-0.178	0.000	0.026	0.028	OO	
4	XOO	0.299	0.314	0.315	0.315	OXX	0.67 σ
	XOX	-0.500	-0.439	-0.432	-0.432	OXO	
	XXO	1.000	1.122	1.139	1.140	OOX	
	XXX	0.194	0.449	0.500	0.506	OOO	
5	XOOO	-0.157	-0.154	-0.154	-0.154	OXXX	0.61 σ
	XOOX	-0.878	-0.861	-0.860	-0.860	OXXXO	
	XOXO	0.701	0.737	0.741	0.741	OXOX	
	XOXX	0.884	0.169	0.181	0.182	OXOO	
	XXOO	0.305	0.372	0.380	0.381	OXXX	
	XXOX	-0.105	-0.169	-0.144	-0.142	OOXO	
	XXXO	1.288	1.500	1.544	1.549	OOOX	
	XXXX	0.555	0.897	0.985	1.000 ⁺¹	OOOO	
	6	XOOOO	-0.547	-0.547	-0.547	-0.547	
XOOOX		-1.250	-1.247	-1.246	-1.246	OXXXXO	
XOOXO		0.372	0.380	0.381	0.381	OXXXO	
XOOXX		-0.169	-0.144	-0.142	-0.142	OXXOO	
XOXOO		0.322	0.039	0.040	0.040	OXOXX	
XOXOX		-0.500	-0.458	-0.453	-0.453	OXOXO	
XOXO		1.169	1.237	1.247	1.248	OXOXX	
XOXXX		0.611	0.732	0.756	0.758	OXOOO	
XXOOO		-0.296	-0.266	-0.263	-0.263	OXXXX	
XXOOX		-0.831	-0.763	-0.753	-0.752	OXXXO	
XXOXO		0.831	0.935	0.952	0.954	OXXOX	
XXOXX		0.296	0.463	0.500	0.504 ⁺¹	OXXOO	
XXXOO		0.500	0.648	0.678	0.681	OOOXX	
XXXOX		-0.043	0.187	0.244	0.252 ⁺¹	OOOXO	
XXXXO	1.603	1.917	2.000	2.014 ⁺¹	OOOOX		
XXXXX	0.893	1.329	1.465	1.496 ⁺¹	OOOOO		

X	XX	XXX	XXXX	
-k for series whose first part is				Second part of series

Figura 7: Tabla de Dixon para la obtención de K. El patrón de respuesta obtenido en la figura 5 (OXXXX00) se divide en dos partes. La primera parte contiene los caracteres iniciales antes de mostrar un cambio en el patrón, y la buscamos en las filas superior (0) o inferior (X) de la tabla dependiendo de cual haya sido la respuesta inicial. En este caso, la respuesta frente al filamento 19 fue "0" y ante el estímulo con el filamento 20 cambió el patrón, por lo que esta primera parte tiene solo un caracter; como fue "0", se busca en el sector superior de la tabla (enmarcado con línea punteada roja). El resto del patrón, en este ejemplo "XXX00", se busca en los laterales de la tabla y en la intersección se encuentra el valor K correspondiente. Como indica la tabla, cuando el primer carácter del patrón es X, el valor de K se multiplica por -1. Modificado de Dixon, 1980.

laterales de la tabla y al intersecar ambas partes se encuentra el valor K correspondiente (ver descripción en la figura 7).

5.5.4 Curso temporal del test de comportamiento

El test de comportamiento se realizó a los 1,2,4,7,9,11,14,16,18 días post inyección del ACF y a los 4,7,11,14,19,22,25 días post-cirugía; utilizando la pata contralateral como control. Para ambos casos se realizaron test de control basal a los días 3 y 2 previos a la intervención. En la figura 8 se esquematiza el protocolo de tratamiento y tests realizados.

Materiales:

- Compartimentos de acrílico
- Plataforma con rejilla de acero
- Set de filamentos de Von Frey (OptiHair, MARSTOCKnervtest)
- Planillas de registro
- Tabla para cálculo de LD 50% de Dixon

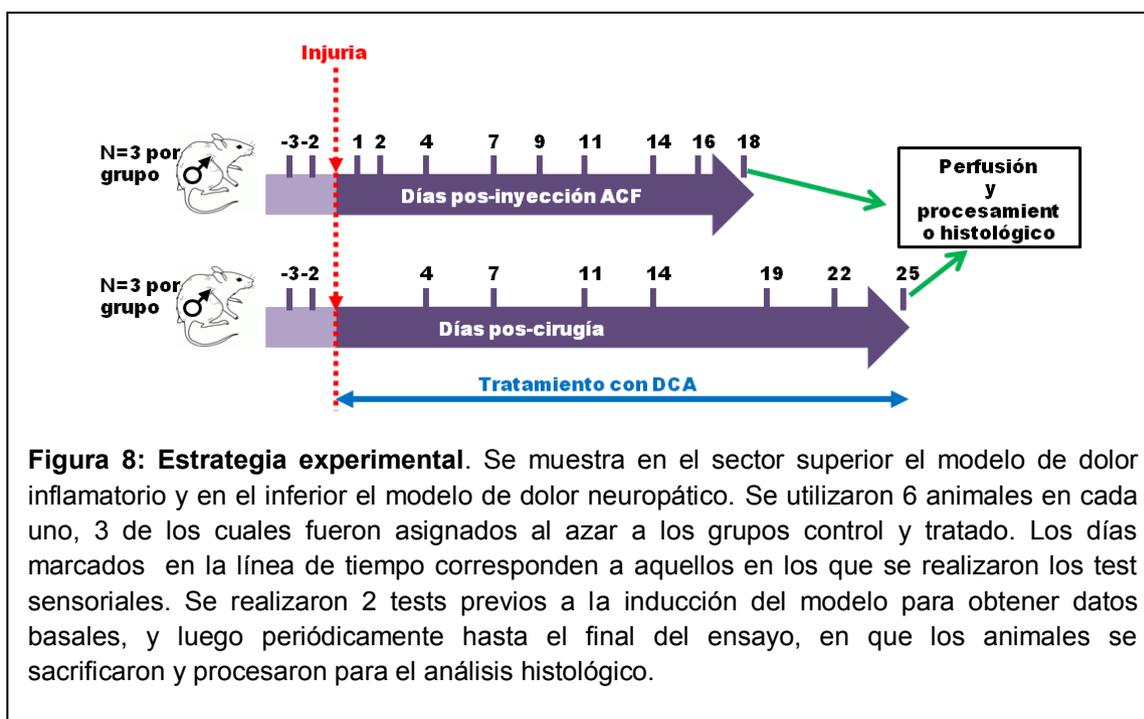


Figura 8: Estrategia experimental. Se muestra en el sector superior el modelo de dolor inflamatorio y en el inferior el modelo de dolor neuropático. Se utilizaron 6 animales en cada uno, 3 de los cuales fueron asignados al azar a los grupos control y tratado. Los días marcados en la línea de tiempo corresponden a aquellos en los que se realizaron los test sensoriales. Se realizaron 2 tests previos a la inducción del modelo para obtener datos basales, y luego periódicamente hasta el final del ensayo, en que los animales se sacrificaron y procesaron para el análisis histológico.

5.6 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

5.6.1 Anestesia y perfusión

Los animales recibieron una inyección intraperitoneal del volumen adecuado de una solución de 25mg/ml de pentobarbital sódico (Sigma) para obtener una dosis de 60 mg/kg y lograr el plano de anestesia profunda. Una vez logrado dicho plano anestésico se realizó su perfusión transcardíaca, para lo cual se expuso el corazón, se perforó la aurícula derecha e inyectó las soluciones a través del ventrículo izquierdo. Mediante un sistema de perfusión por gravedad, se hizo pasar una solución de lavado (PBS 1X) para eliminar la sangre, y seguidamente el fijador (paraformaldehído 4% en PBS, pH=7,4) en un volumen en ml similar al peso en g del animal (aprox 250ml). De esta forma se logró la fijación del animal completo, introduciendo la solución fijadora a través del sistema circulatorio permitiendo su acceso a todas las células del tejido gracias a la red de capilares.

Las médulas espinales lumbares de los animales fueron cuidadosamente disecadas, postfijadas por inmersión en el mismo fijador durante 24 horas a 4°C y mantenidas en PBS a 4°C hasta su procesamiento. Inmediatamente luego de la disección, el asta ventral izquierda de las médulas lumbares se

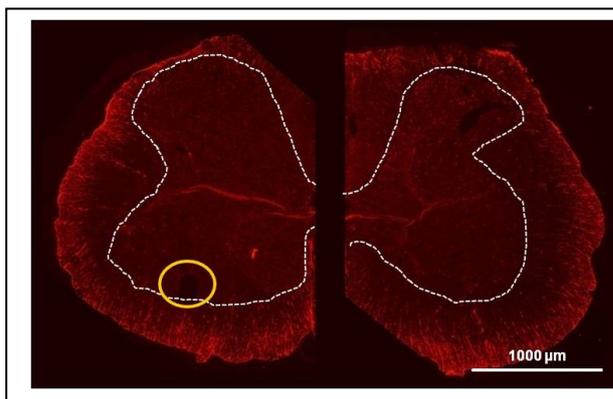


Figura 9: Corte transversal de médula espinal inmunomarcado para GFAP fotografiado en microscopio de epifluorescencia. La línea punteada blanca delimita la sustancia gris de la blanca. El círculo amarillo resalta el orificio de referencia generado en el asta ventral contralateral a la cirugía o inyección antes de su corte en crióstato.

atravesó con una aguja delgada, de manera de facilitar luego el reconocimiento del lado ipsi y contra lateral a la lesión en los cortes, como se muestra en la imagen de la figura 9. Esto resulta importante en los casos en que se procesan los cortes en flotación.

Tanto la preparación de PFA, como la perfusión y la disección, se realizaron bajo campana de extracción de gases para evitar los efectos tóxicos del fijador.

Soluciones:

- Pentobarbital sódico (10 ml, 25mg/ml): 0.25g Pentobarbital sódico (Sigma), 1ml alcohol 96°, 2ml propilenglicol, 7ml agua destilada
- Buffer Fosfato Salino (PBS) (5L, pH=7.4): 40g NaCl, 1g KCl, 5.72g Na₂HPO₄, 1g KH₂PO₄ en agua destilada
- Paraformaldehído (PFA) 4% (1L, pH=7,4): 1L PBS, 40g PFA (Sigma), perlas de NaOH

Materiales:

- Jeringa de 1ml
- Material de disección: tijeras, pinzas, bisturí
- Sistema de perfusión por gravedad: Aguja mariposa, catéter, tubuladuras, botellas de suero
- Bandeja de soporte para perfusión
- Campana de extracción de gases

5.6.2 Obtención de secciones de tejido en crióstato

Las muestras fueron crioprotegidas (sacarosa 30%) durante al menos 48 hs. Para realizar los bloques para cortar a congelación se construyeron moldes de papel de aluminio del tamaño adecuado, los cuales se llenaron con el medio de inclusión en el cual se sumergieron las muestras. Para el congelado rápido necesario para evitar alteraciones de la muestra se utilizó el sistema Peltier (efecto que consiste en la creación de una diferencia térmica a partir de una diferencia de potencial eléctrico) con que cuenta el crióstato que utilizamos. De no contar con este sistema, el congelado rápido se puede obtener sumergiendo los bloques en nitrógeno líquido. Una vez solidificado el medio de inclusión, los bloques se sacaron de los moldes y se cortaron en crióstato a -20°C. Se obtuvieron secciones de 6µm, recolectadas en portaobjetos gelatinizados, y secciones de 30 µm que se recogieron en flotación dentro de tubos eppendorf con solución de de Olmos, una solución crioprotectora que permite el almacenamiento de las muestras a baja temperatura (de Olmos y col., 1978). Todas las secciones se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento histo- o inmunohistoquímico.

Soluciones:

- Sacarosa (Sigma) al 30% en PBS
- Solución de Olmos 0,01M, preparación de 1L: 400ml agua destilada, 200g sacarosa, 0.28 NaH₂PO₄·2H₂O, 2.17g Na₂HPO₄·7H₂O, 300ml etilenglicol, 10g polivinil-pirrolidona

Materiales:

- Crióstato Leica CM1850UV
- Medio de inclusión para corte en congelación (Cryomatrix, Thermo, electron corporation)
- Papel de aluminio para moldes de bloques
- Portaobjetos gelatinizados
- Tubos Eppendorf de 1,5ml

5.6.3 Histoquímica e Inmunohistoquímica

Con el fin de detectar la población astrocitaria y microglial, sobre las secciones obtenidas con el crióstato, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia y histoquímica respectivamente, tanto sobre los cortes en lámina como los cortes en flotación.

5.6.3.1 Fundamento de la Histoquímica de lectinas

Las técnicas histoquímicas son aquellas que suponen una reacción química en la que intervienen moléculas pertenecientes al propio tejido de estudio. El objetivo de la histoquímica es poner de manifiesto una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica y estudiar su distribución tisular "in situ" (Molist y col., 2011).

En los últimos años ha crecido el uso de las lectinas en las técnicas de histoquímica. Las lectinas son moléculas que reconocen de forma selectiva residuos de diferentes azúcares que se encuentran en la superficie de varios tipos celulares. Actualmente están disponibles comercialmente distintos tipos de lectinas conjugadas a algún sistema de detección, ya sea enzimático, fluorescente o de otro tipo. La lectina de *Lycopersicon esculentum* o lectina de tomate, reconoce los residuos de azúcar poli-N-acetil-glucosamina, que se encuentran en la membrana plasmática y en el citoplasma de microglia y en la

superficie de células endoteliales, siendo utilizada para identificar dichos tipos celulares en el SNC (Acarin y col., 1994).

En este trabajo, para marcar la microglía utilizamos una lectina de tomate conjugada a la molécula biotina, la cual es luego detectada mediante la unión de estreptavidina ligada a un fluorocromo.

5.6.3.2 Fundamento de la Inmunohistoquímica

Esta técnica se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y es ampliamente utilizada para localizar moléculas de interés, principalmente proteínas. Existen dos métodos básicos en relación a la detección del anticuerpo específico unido al antígeno de interés en el tejido: a) **directo**, ventajoso por su sencillez y rápida realización, que consiste en la utilización de un anticuerpo específico para el antígeno de interés, que denominamos **primario**, que lleva asociada la marca que permitirá localizar el antígeno en la muestra de estudio. b) **indirecto**, se utiliza un anticuerpo primario que reconoce el antígeno, el cual no lleva marca, y un anticuerpo **secundario** marcado, que reconoce la región constante de la cadena pesada del anticuerpo primario. Este método, aunque más laborioso, permite amplificar la señal, siendo especialmente útil a la hora de valorar señales débiles presentes en el tejido. En ambos métodos los anticuerpos se pueden marcar con distintas moléculas, tales como fluorocromos, enzimas, elementos radiactivos u oro coloidal, según se quieran detectar antígenos en microscopía de luz visible, fluorescente, o microscopía electrónica de transmisión (Molist y col., 2011).

En nuestro caso, para detectar la población astrocitaria utilizamos anticuerpos primarios dirigidos contra la molécula GFAP, o proteína ácida fibrilar glial. GFAP es una proteína perteneciente a la familia de filamentos intermedios de tipo III. Se expresa predominantemente en astrocitos maduros del SNC, siendo el marcador clásico por excelencia para este tipo celular. Su expresión aumenta significativamente en procesos patológicos dentro del SNC, como la astrogliosis reactiva y la formación de la cicatriz glial (Wang y Bordey, 2008; Sofroniew y Vinters, 2010).

5.6.3.3 Protocolo empleado

Los cortes de 6µm fueron procesados en la lámina, previa delimitación del espacio que ocupan los cortes con un lápiz graso. Los cortes de 30µm fueron colocados en los pocillos de una placa multipocillos de 24 y procesados en flotación, luego de lo cual se transfirieron a láminas portaobjetos. En primer lugar los cortes fueron lavados con PBS, y luego permeabilizados con 0,2 % de Tritón X-100 en PBS. Este paso facilita la penetración de las moléculas proteicas de lectina o inmunoglobulinas en el tejido.

Para la histoquímica los cortes fueron incubados sucesivamente con: lectina de tomate biotinilada diluida en la misma solución de permeabilización (Sigma, 1:150, toda la noche a 4°C), PBS (3 lavados de 10 minutos), estreptavidina conjugada al fluorocromo AlexaFluor⁴⁸⁸ (Invitrogen, 1:800) en PBS por 1 hora a temperatura ambiente, PBS (3 lavados de 10 minutos).

Para la inmunodetección de GFAP, luego de la permeabilización se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos utilizando una solución de bloqueo de PBS con tritón conteniendo alta concentración proteica (albúmina sérica bovina, BSA 2%) y suero de cabra (10%), ya que los anticuerpos secundarios a utilizar fueron generados en esta especie. Luego los cortes fueron incubados con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP no conjugado (Sigma, 1:600) u otro conjugado a Cy3 (Sigma, 1:600) diluidos en solución de bloqueo, toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 10 minutos con PBS los cortes procesados con el anticuerpo primario no conjugado se incubaron con un anticuerpo secundario anti inmunoglobulina de ratón generado en cabra ligado al fluorocromo AlexaFluor⁵⁹⁴, y luego fueron lavados nuevamente 3 veces con PBS.

Para visualizar los núcleos celulares todos los cortes se incubaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1µg/ml, Invitrogen), por 10 minutos. El DAPI es una sonda que se intercala en el ADN y emite en el rango de los 461 nm cuando es excitada con la luz ultravioleta o el laser correspondiente.

Luego de las incubaciones que se describieron, y luego de transferir los cortes de 30 µm a las láminas portaobjetos, éstas fueron montadas con un medio de montaje acuoso (glicerol al 80% en PBS) y un cubreobjetos para su posterior observación y obtención de imágenes.

Soluciones:

- PBS
- Solución de permeabilización: PBS, Tritón 0.2 %
- Solución de bloqueo: PBS, suero de cabra 10%, albúmina sérica bovina (BSA) 2%, Tritón 0.2 %

Materiales:

- Lectina de tomate biotinilada
- Estreptavidina ligada al fluorocromo AlexaFluor⁴⁸⁸
- Anticuerpo anti GFAP generado en ratón ligado al fluorocromo cianina 3 (Cy3)
- Anticuerpo anti GFAP generado en ratón
- Anticuerpo anti inmunoglobulina de ratón generado en cabra ligado a AlexaFluor⁵⁹⁴

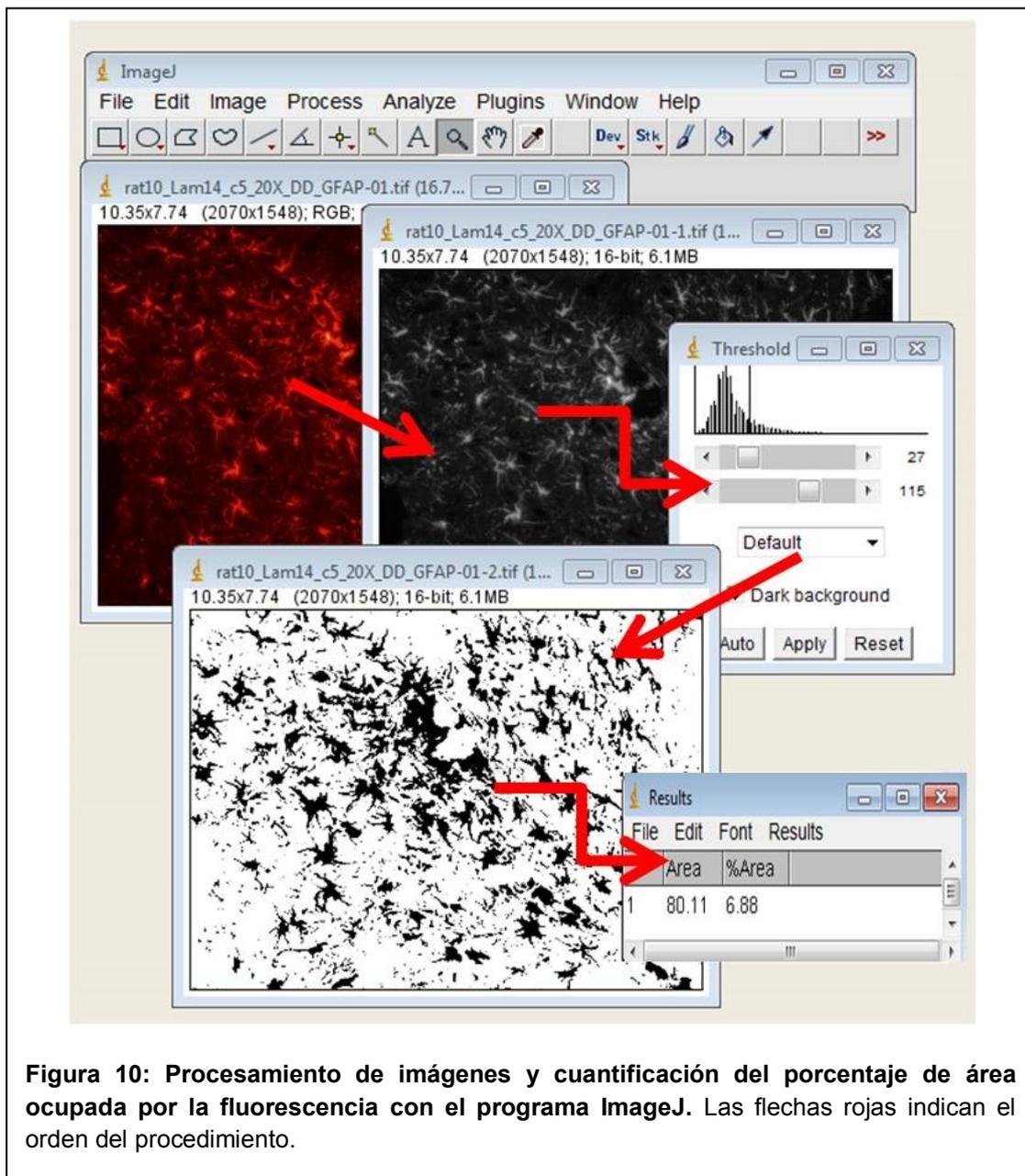
5.7 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Para el análisis de los cortes y obtención de imágenes se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 equipado con una cámara fotográfica Olympus DP-71 y un microscopio confocal LEICA TCS SP5 II, ambos de la Unidad de Microscopía Confocal de la Facultad de Medicina.

Para la cuantificación del área ocupada por la señal fluorescente de interés, las imágenes se obtuvieron de 5 a 7 cortes de la región lumbar L5 de la médula espinal separados por al menos 200 μ m para abarcar la mayor parte del segmento y evitar la cuantificación en regiones contiguas. Para cada corte se adquirió una imagen de la región del asta dorsal ipsilateral y otra de la contralateral a la lesión. Los parámetros de tiempo de exposición y sensibilidad en el microscopio de epifluorescencia, y de intensidad y ganancia de los láseres en el microscopio confocal fueron mantenidos en los mismos niveles para la obtención de todas las imágenes.

En las imágenes adquiridas se cuantificó el área ocupada por la fluorescencia respecto al área total de la imagen utilizando el programa ImageJ. Para ello, se fijó la escala métrica correspondiente, y se estableció el área como parámetro a medir (en "Analyze" → "Set measurements" → área). A continuación, como se muestra en la figura 10, cada imagen se transformó a escala de grises (16bit) y

se estableció el umbral de intensidad (ver nivel de “threshold”) a partir del cual se considera señal positiva o negativa. Luego de aplicar el umbral, el área que se medirá como positiva queda en negro y el fondo sin señal en blanco (imagen inferior de la figura). Seguidamente, se procede a medir el área (en “Analyze” → “Measure”), y se obtienen los resultados en la tabla que luego se transfieren al programa adecuado para su análisis. El umbral establecido se mantuvo para todas las imágenes de los distintos grupos de animales.



5.8 ANÁLISIS DE DATOS

5.8.1 Medidas de volumen del miembro posterior:

Los datos obtenidos de cada miembro posterior se presentan como la media de las medidas obtenidas de 3 animales \pm el error estándar de la media (SEM). En cada punto de medida (días -1, 1, 3, 8 y 13) los datos obtenidos de la pata inyectada con ACF y la contralateral se compararon mediante el test de Student.

5.8.2 Pruebas conductuales:

Para evitar sesgos en las pruebas sensoriales se solicitó ayuda a otros compañeros del grupo para que colocasen a las ratas en los cubículos acrílicos, de manera que los tests se realizaron a ciegas del tratamiento recibido por el animal y/o de su comportamiento en tests previos.

Los datos fueron normalizados con respecto a los basales correspondientes de cada grupo. Los umbrales calculados en los tests de comportamiento fueron considerados con una distribución no paramétrica, y los datos fueron comparados por test ANOVA para mediciones repetidas seguido de posttests de Bonferroni.

5.8.3 Estudios histológicos:

Se realizaron comparaciones del área ocupada por la fluorescencia entre los datos obtenidos del sector ipsi y contralateral del asta dorsal de los animales tratados y no tratados. Todos los valores fueron expresados como la media \pm SEM. La comparación entre los 4 grupos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de posttests de Bonferroni.

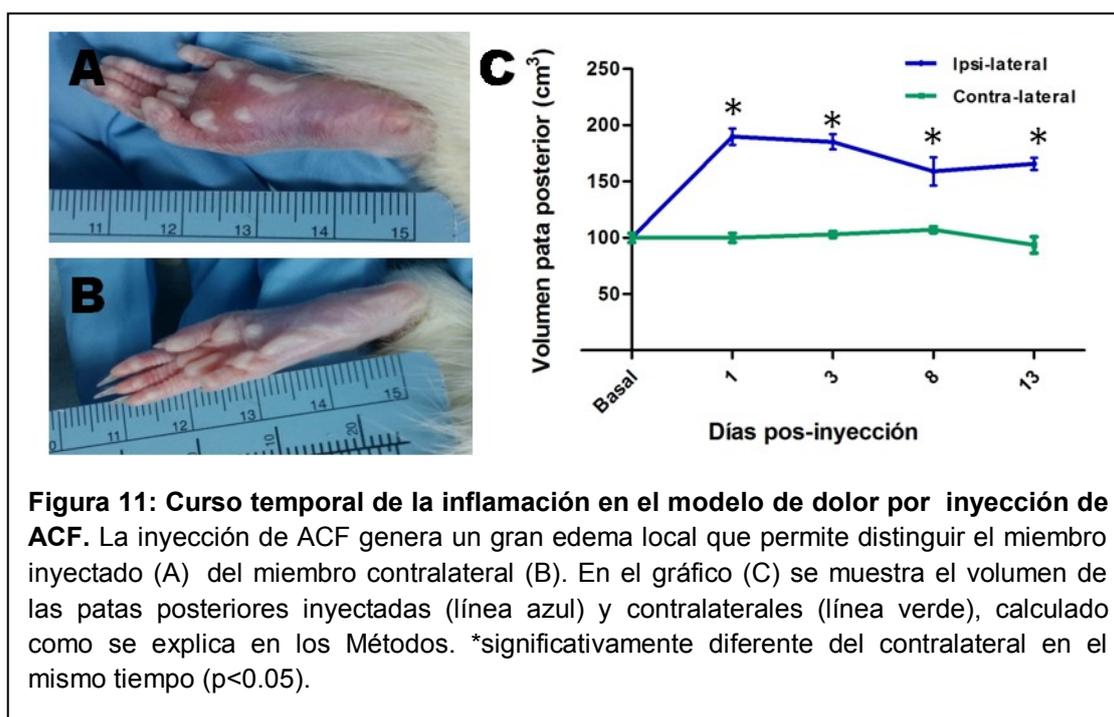
Los estudios estadísticos de los datos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prisma 5. Las diferencias se consideraron significativas cuando p fue menor que 0.05.

6. RESULTADOS

6.1 PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO POR INYECCIÓN INTRAPLANTAR DE ACF

6.1.1 La administración intraplantar de ACF provocó tumefacción local

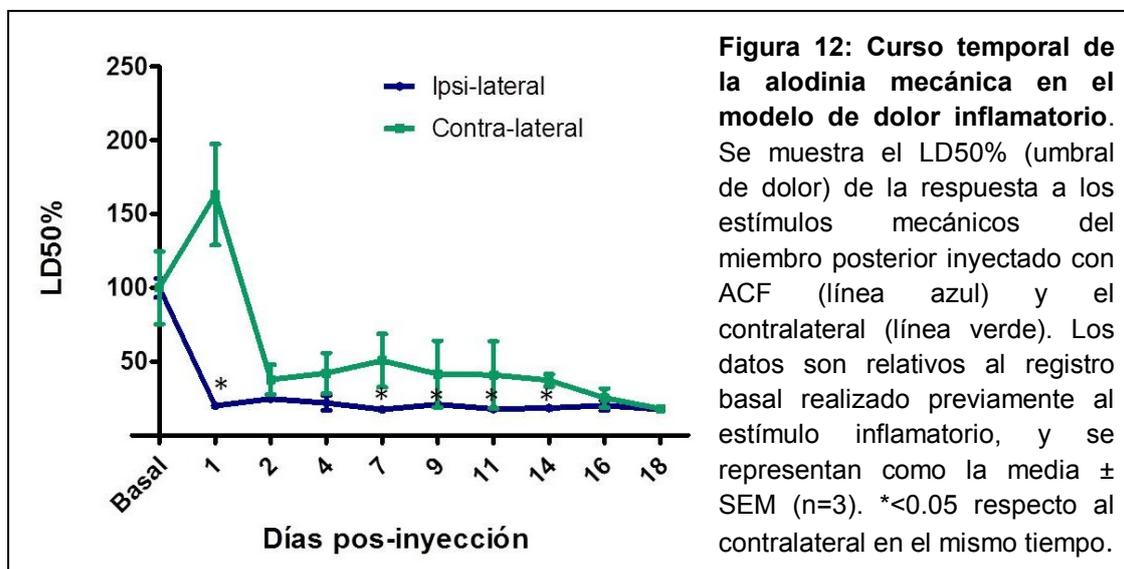
La inyección intraplantar de ACF en el miembro posterior derecho provocó, como se esperaba, inflamación a nivel local, caracterizada por tumefacción y eritema (enrojecimiento) como se observa en la figura 11A, en comparación con el miembro contralateral (figura 11B). Esta tumefacción ya estaba presente a las 24 horas de la administración de ACF, y permaneció de aspecto similar en los tiempos estudiados hasta el día 13 post-inyección (figura 11C).



6.1.2 La administración intraplantar de ACF provocó disminución del umbral de respuesta a estímulos mecánicos

En los tests sensoriales, realizados mediante estímulo mecánico con los filamentos de von Frey, el umbral de retirada de la pata frente a las distintas fuerzas aplicadas, representado como el LD50%, fue significativamente menor en el miembro posterior inyectado con ACF respecto al contralateral (figura 12). Este umbral se mantuvo en valores menores a los de la pata contralateral

desde el día 1 hasta el día 14 post-inyección. A partir de ese momento, llamativamente, la pata contralateral mostró una disminución en dicho umbral en comparación con su latencia basal, acercándose a los valores de la pata ipsilateral (figura 12), lo cual ha sido previamente reportado (Raghavendra y col., 2004).



6.1.3 La administración intraplantar unilateral de ACF no generó diferencias significativas en el marcado de células gliales en la médula espinal

En lo que respecta a la respuesta glial, se esperaba un cambio en la morfología y en la expresión de los marcadores característicos utilizados, lo cual ha sido descrito en varios modelos de dolor crónico, (McMahon y Malcangio, 2009). Para determinar si la inyección intraplantar de ACF generó esta respuesta típica en astrocitos y microglía, se realizaron estudios de inmunofluorescencia para GFAP e histoquímica de lectina respectivamente en la médula espinal lumbar L5-L6 de los animales control al final del período de ensayo. En la figura 13 se muestra el marcado para astrocitos por inmunofluorescencia para GFAP (figura 13 A) y para microglía mediante lectina de tomate (figura 13 B). Si bien el marcado para ambos tipos celulares en estas imágenes aparenta ser mayor en el asta dorsal medular ipsilateral a la inyección de ACF, cuando se cuantificó el área ocupada por la señal, no se encontraron diferencias significativas, como se ve en los gráficos de la figura 15. En aquellos cortes que presentaban una

diferencia aparente, a mayor aumento observamos que del lado ipsilateral, el cambio morfológico en los astrocitos se caracterizó por hipertrofia y formación de prolongaciones delgadas y ramificadas como mostramos en la figura 13 C. En el caso de la microglía con pudimos observar solamente un leve aumento del tamaño de los cuerpos celulares, ya que los procesos fueron difíciles de detectar con esta técnica (figura 13D). Considerando estos resultados, un dato a tener en cuenta es que parece haber un marcado más intenso de los controles en todas las regiones tanto ipsi como contralateral, aunque no lo

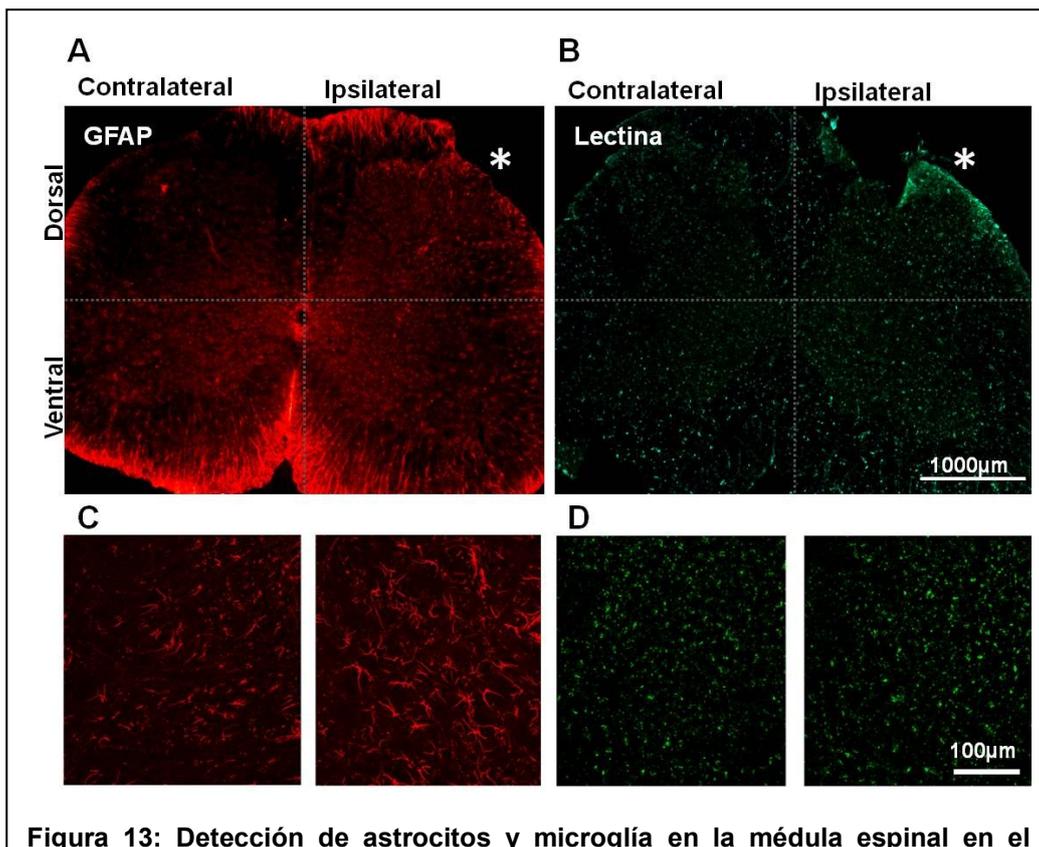


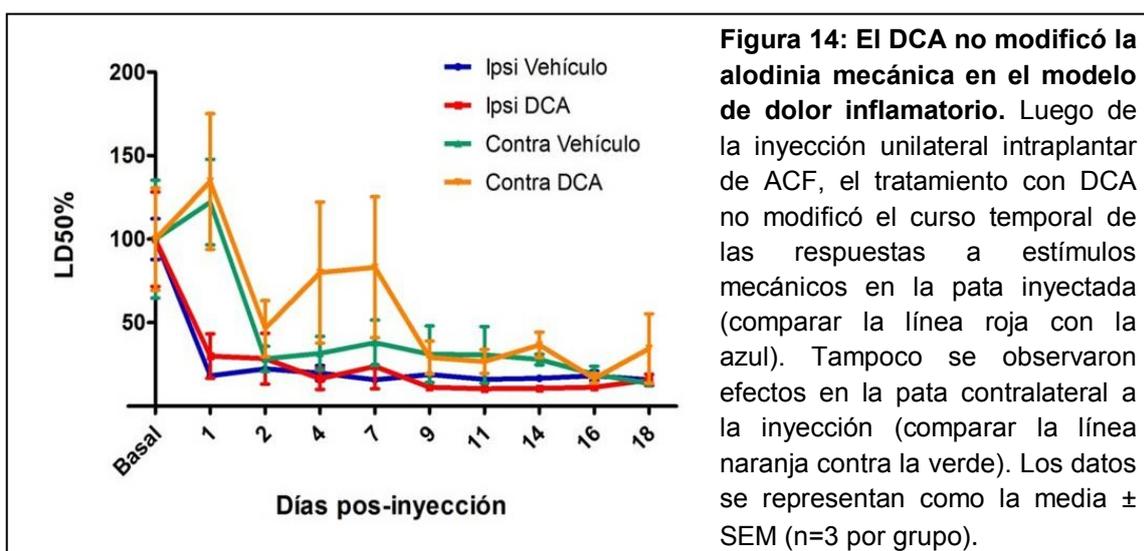
Figura 13: Detección de astrocitos y microglía en la médula espinal en el modelo de dolor inflamatorio. A, B. Microfotografías de dos cortes transversales de médula espinal tomadas con microscopio de epifluorescencia a bajo aumento (4x). Las líneas punteadas subdividen cada imagen en 4 aéreas correspondientes a las 4 astas de sustancia gris de la médula espinal. En las microfotografías seleccionadas, en el área del asta dorsal ipsilateral a la inyección de ACF (asterisco) se observa mayor reactividad glial que en las regiones del asta dorsal contralateral, tanto para astrocitos (inmunofluorescencia para GFAP; A) como para microglía (marcado con lectina de tomate, B). **C, D.** La astrogliosis se caracteriza por hipertrofia y aumento de longitud y grosor de las prolongaciones celulares observadas del lado ipsilateral a la inyección de ACF(C). En las regiones con aparente mayor marcado con lectina de tomate, se evidenciaron pocos cambios, solamente mayor tamaño de los cuerpos celulares (D).

podemos asegurar por no tener controles sin inyectar con ACF procesados al mismo tiempo que los tratados.

6.2 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DEL DCA EN EL DOLOR INFLAMATORIO.

6.2.1 El tratamiento con DCA no modificó la respuesta a estímulos mecánicos en el modelo de dolor inflamatorio crónico

Para analizar si la modulación metabólica podría modificar la alodinia mecánica presente en el dolor crónico, se inyectó ACF en el miembro posterior derecho de un grupo de 6 animales, 3 de los cuales fueron tratados con DCA (500 mg/L) en el agua de beber mientras los 3 animales restantes recibieron solamente el agua habitual, vehículo del tratamiento del grupo tratado, quedando como grupo control. Se realizaron los tests sensoriales con los filamentos de von Frey y se compararon los valores de LD50%, de los animales tratados con respecto a los controles, obtenidos a lo largo del ensayo. Como se observa en la figura 14, el tratamiento con DCA no redujo la alodinia inducida por la inyección de ACF.



6.2.2 El tratamiento con DCA disminuyó la señal de los marcadores gliales en el modelo de dolor crónico

Para analizar el efecto del DCA sobre la reactividad glial en la médula espinal, luego de 18 días de la inyección de ACF, los animales fueron fijados por perfusión intracardíaca y se procesó la médula espinal para las técnicas de histoquímica de lectina e inmunofluorescencia contra GFAP para la detección de microglía y astrocitos respectivamente.

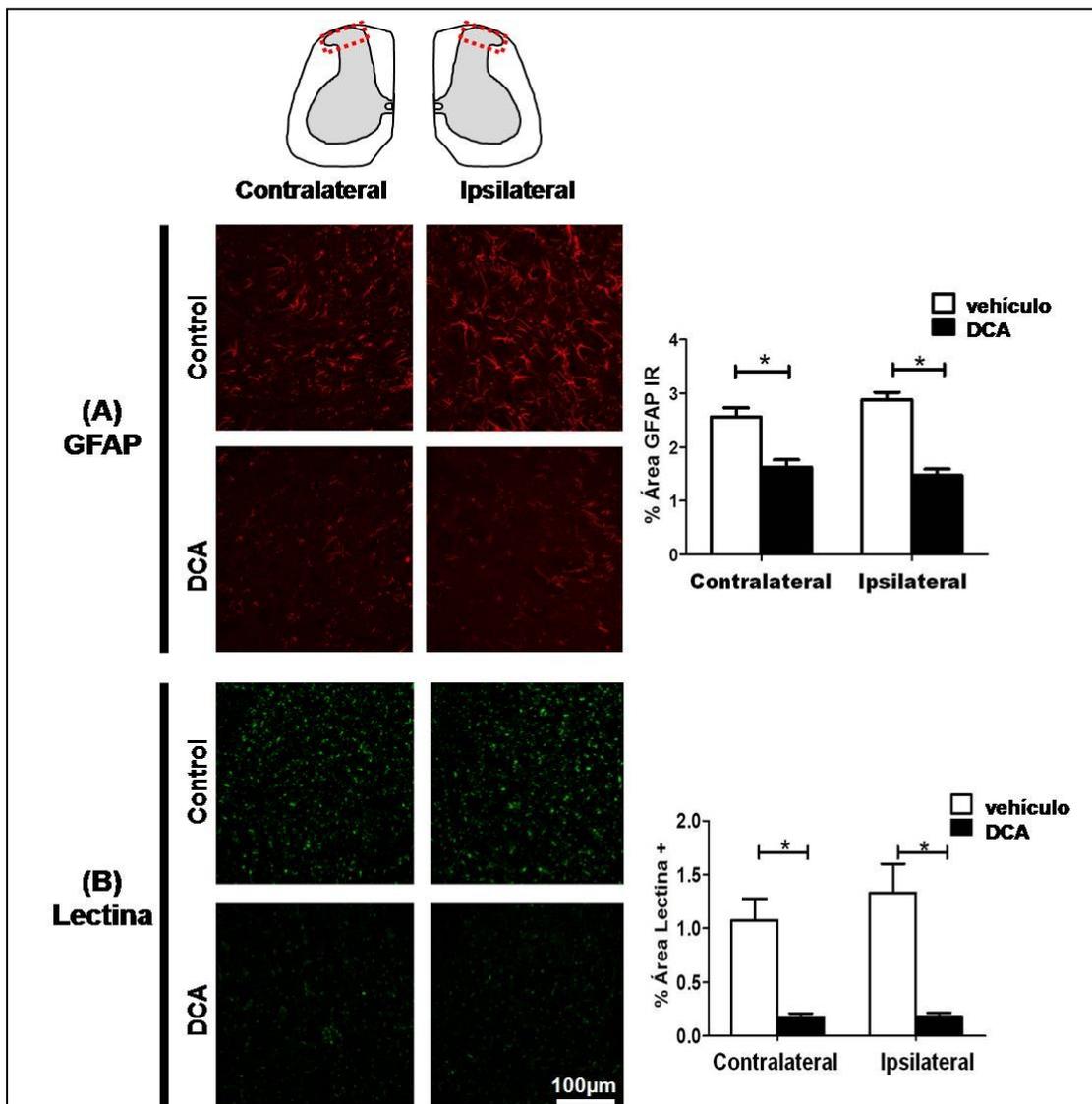


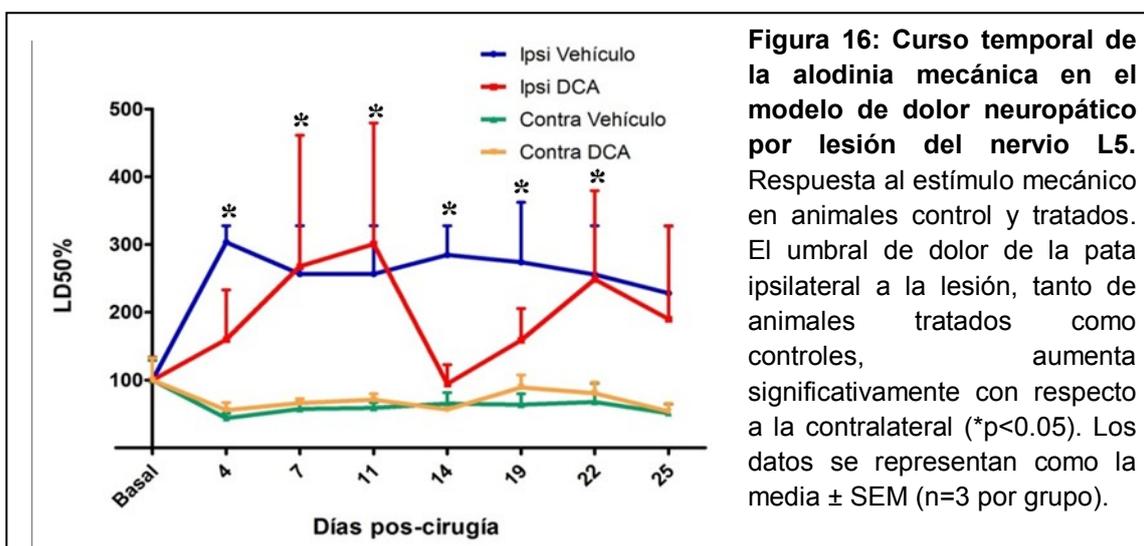
Figura 15: El DCA indujo una disminución en los marcadores de astrocitos y microglía en la médula espinal en el modelo de dolor inflamatorio. Imágenes de microscopio confocal (a izquierda) mostrando la inmunorreactividad para GFAP (A), e histoquímica para lectina (B) del sector del asta dorsal delimitado con la línea punteada roja arriba en el dibujo. A la derecha se muestra la cuantificación del área de fluorescencia para cada marcador. No se obtuvieron diferencias significativas entre los marcadores gliales del lado ipsi y contralateral a la lesión, pero el DCA redujo la astrogliosis y la reactividad microglial en ambos lados (* $p < 0.05$).

Se calculó el porcentaje de área de fluorescencia como parámetro de la reactividad glial en las fotografías obtenidas del asta dorsal ipsi y contra-lateral de las secciones de médula espinal. Como se menciona antes, la cuantificación de la inmunorreactividad para lectina y GFAP no mostró diferencias significativas entre el lado ipsi y contralateral a la inyección de ACF. Sin embargo, la marcación para GFAP y lectina presente en la médula espinal fue reducida de forma significativa por el tratamiento con DCA ($p < 0.05$) (figura 15). En las microfotografías de la figura 15 se puede observar que las células GFAP positivas de los animales control presentan más ramificaciones que las de los animales tratados con DCA. También se puede observar que las células Lectina positivas son de mayor tamaño en el caso de los animales control, mientras que en los animales tratados con DCA se observan como células más pequeñas.

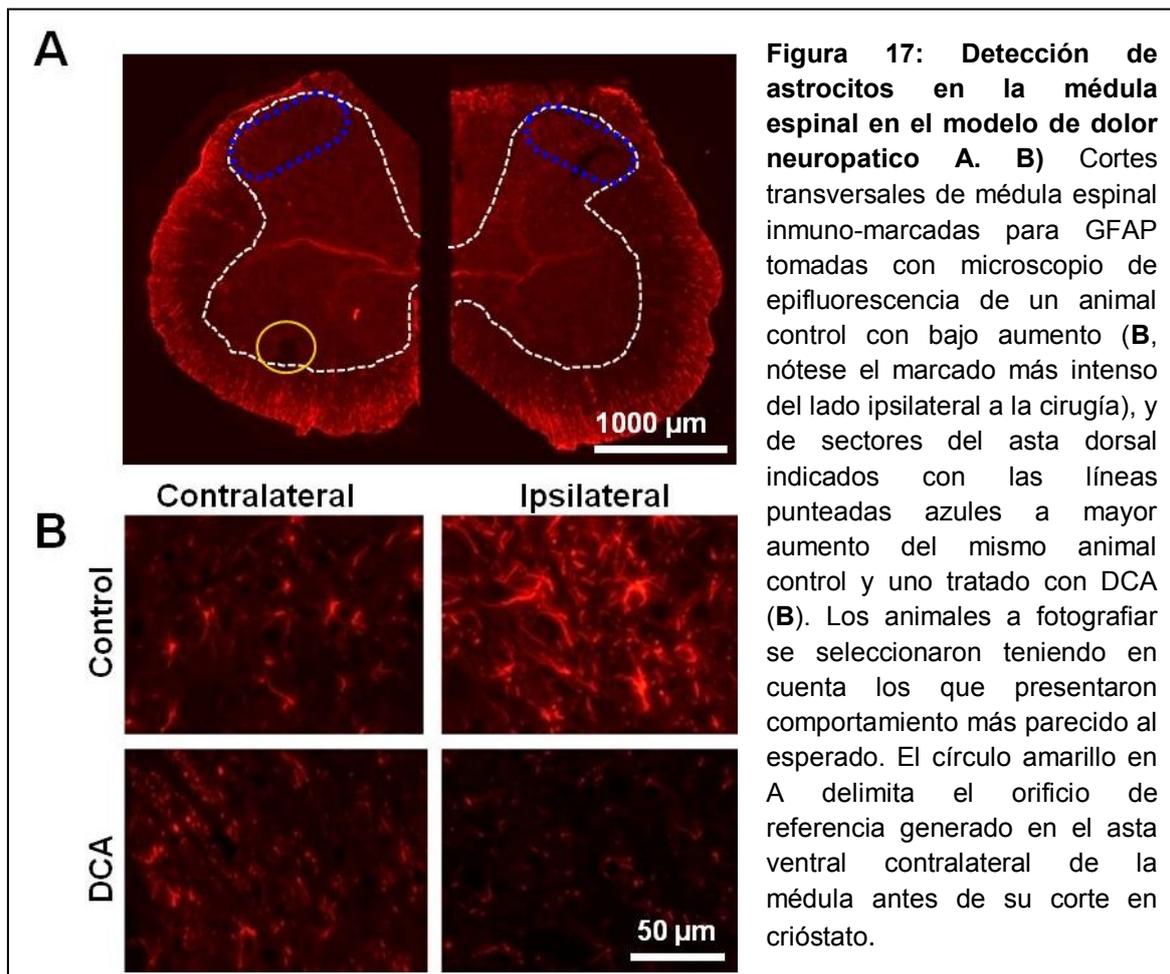
6.3. PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE DOLOR NEURÓPÁTICO POR LESIÓN DEL NERVIOS L5 Y ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DEL DCA.

Para la generación del modelo de dolor neuropático se utilizaron 6 animales; se ligó a L5 y se cortó distal a la ligadura (Chaplan et al., 1994) como se explica en la sección Materiales y Métodos. Los animales se separaron en 2 grupos ($n=3$ por grupo), uno de los cuales recibió DCA en el agua de beber y el otro permaneció como grupo control; fueron mantenidos hasta los 21 días durante los cuales se realizó el test sensorial explicado anteriormente.

Al evaluar la respuesta a estímulos mecánicos, al contrario de lo esperado, el



umbral de respuesta fue mayor en el miembro ipsilateral a la cirugía que en el contralateral, no observándose modificaciones con el tratamiento con DCA, como se muestra en el gráfico de la figura 16, Luego de los 21 días de la cirugía, los animales fueron sacrificados y perfundidos con PFA 4% para el procesamiento histológico. En el momento de la disección verificamos que en todos los animales la ligadura y el corte habían sido realizados en el extremo proximal del nervio ciático y no en su rama de origen, el nervio espinal L5 como se pretendía. Si bien el modelo no fue correctamente realizado, algunos cortes de estos animales fueron procesados para inmunofluorescencia contra GFAP teniendo en cuenta aquellos cuyo comportamiento en el test sensorial se acercó más al esperado (Chaplan y col., 1994). En la figura 17A, se muestra un corte de la médula espinal de un animal control, que presenta inmunorreactividad aumentada en la hemi-médula ipsilateral a la cirugía. Con mayor aumento, en B se muestran imágenes del asta dorsal ipsi y contralateral del mismo animal, y de un animal tratado con DCA.



7. DISCUSIÓN

En los últimos años, en el campo de la investigación del dolor ha surgido un creciente reconocimiento de la importancia de las células no neuronales, especialmente de las células gliales, en la iniciación y mantenimiento de dolor crónico y agudo. La activación de las células gliales del SNC, en particular astrocitos y microglía y las interacciones neurona-glia están surgiendo como mecanismos claves en el desarrollo y mantenimiento de dolor crónico, llevando a algunos autores a plantearse el dolor crónico como resultado de una "gliopatía", es decir, la desregulación de las funciones gliales en el SNC y SNP (Ji y col., 2013).

Nuestro grupo de investigación, ha demostrado que en modelos de la enfermedad neurodegenerativa ELA, los astrocitos reactivos presentan una remodelación metabólica que incluye disminución de la actividad respiratoria mitocondrial asociada a una alta proliferación y neurotoxicidad y que la modulación metabólica con el fármaco DCA redujo la disfunción mitocondrial y la reactividad glial en la médula espinal, además de mejorar los síntomas motores en el modelo animal de dicha enfermedad (Miquel, Cassina y col., 2012). Las distintas funciones de la mitocondria han sido relacionadas con mecanismos de dolor, incluyendo el sistema generador de energía, la producción de especies reactivas y estrés oxidativo, la permeabilidad del poro de transición, las vías apoptóticas y la movilización de calcio intracelular (Sui y col., 2013). Por ejemplo, la inyección intratecal de un inhibidor del complejo de transporte de electrones, antimicina A o la rotenona, en ratones normales, resultó en una hiperalgesia mecánica de larga duración asociada con la producción de superóxido mitocondrial a nivel del asta dorsal de la médula espinal (Kim y col., 2008). En este sentido nos preguntamos si el tratamiento con DCA podría reducir la reactividad glial en la médula espinal que aparece en los modelos de dolor crónico, y disminuir la alodinia que los caracteriza. Para responder esta pregunta, nos planteamos como primer objetivo la puesta a punto de un modelo de dolor crónico, con el que no contábamos en el laboratorio, en el cual estudiar el efecto de este fármaco.

Elegimos desarrollar un modelo de dolor inflamatorio crónico mediante la inyección unilateral de ACF intraplantar reportado inicialmente por Stein y col. (1988), y un modelo de dolor neuropático por ligadura y corte del nervio espinal L5 (Chaplan y col., 1994). Para su caracterización utilizamos un test comportamental donde evaluamos la respuesta al estímulo mecánico con filamentos de von Frey, y realizamos un análisis histológico para detectar reactividad glial en la médula espinal.

Para una mayor reproducibilidad de los resultados, se utilizaron ratas machos, de manera de evitar la variabilidad de las respuestas por cambios hormonales que podrían ocurrir en hembras.

Como se esperaba, la administración periférica de ACF provocó un proceso inflamatorio visible, que cuantificamos tomando medidas de longitud, ancho y espesor de las patas posteriores, con la finalidad de calcular su volumen. Se observó diferencias significativas en el volumen calculado para las patas inyectadas con ACF respecto a las contralaterales (no inyectada). La evaluación de este parámetro resulta importante, ya que puede dar pautas para determinar si un tratamiento puede producir una acción periférica o central dependiendo del resultado. Por este motivo pensamos que se debe afinar el método, utilizando algún otro sistema que implique por ejemplo medir el volumen de líquido desplazado (Fereidoni y col., 2000) que sea más aceptado y más sensible.

El ACF causó una disminución significativa en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos de las patas inyectadas con respecto a las contralaterales. Si bien esto era también esperable, evidencia que la utilización de este modelo y su evaluación sensorial son reproducibles en el laboratorio. Dicho umbral de retirada de la pata, representado como el LD50%, disminuyó significativamente al día 1 post-inyección y se mantuvo en valores menores a los de la pata contralateral hasta el día 14, por lo cual se podría considerar en una próxima aproximación, detener el ensayo a los 14 días pos inyección, en lugar del día 18 (Raghavendra y col., 2004). Es interesante notar, que a pesar de las diferencias entre los umbrales de respuesta a estímulos mecánicos ipsilateral y contralateral, no esperábamos que el contralateral disminuyera tanto con respecto a su basal. Este descenso no esperado podría explicar la

elevada marcación con GFAP y lectina encontrada en el asta dorsal contralateral, dato que no coincide con lo reportado en la literatura.

En relación a los estudios de inmunofluorescencia e histoquímica, éstos no revelaron diferencias en los marcadores GFAP y lectina en el asta dorsal ipsilateral al miembro inoculado comparado con el lado contralateral, lo cual puede explicarse en parte porque el número de animales es muy bajo, y porque el máximo de reactividad glial es alcanzado antes del tiempo al cual se detuvo el ensayo (Echeverry y col., 2008). En próximos estudios pretendemos utilizar tiempos más cortos, como 14 días para ajustarnos a los tiempos de mayor expresión de los marcadores que utilizamos.

En relación al tratamiento con DCA, a pesar de que éste no reveló efecto significativo sobre la alodinia mecánica, la reactividad glial en la médula espinal se redujo de forma significativa, como se muestra en el análisis de la cuantificación de la inmunofluorescencia para GFAP y la histoquímica de lectina. Esta disminución en la reactividad glial concuerda con la menor astrogliosis encontrada luego del mismo tratamiento en el modelo de ELA (Miquel, Cassina y col., 2012), sugiriendo que algunos mecanismos pueden ser similares, involucrando una alteración del metabolismo y disfunción mitocondrial. La ausencia de diferencias significativas en el umbral de dolor en los animales tratados con DCA, no excluye un posible efecto del fármaco, ya que existe una gran variabilidad inherente a los propios ensayos de comportamiento. Ello implica la necesidad de un número mayor de animales que en otro tipo de ensayos. Es probable que la falta de soporte estadístico en este caso se pueda revertir aumentando el n, por ejemplo un número mínimo de 6 por grupo.

En relación al modelo de dolor neuropático por lesión del nervio L5 (Chaplan y col., 1994), al evaluar la alodinia mecánica, los miembros ipsi-laterales a la lesión presentaron un mayor umbral de dolor que sus respectivos miembros contra-laterales, o sea que presentaban una hipoalgesia. Estos datos fueron confirmados al momento de la disección de la médula espinal al final del período de tratamiento, dado que se observó que la ligadura y el corte realizados en la cirugía no abarcaron solamente L5, sino que resultaron estar en el extremo proximal del nervio ciático, abarcando L5 y L4. Por tanto, la

hipoalgesia observada pudo deberse a la denervación de los tejidos distales. Consideramos que este modelo de dolor neuropático no fue el más apropiado debido a las dificultades técnicas que implican la correcta localización y ligadura de L5 en la cirugía. En nuestro laboratorio recientemente, se está poniendo a punto otro modelo de dolor neuropático, denominado constricción crónica del nervio ciático (Bennett y Xie, 1988), que presenta una menor dificultad técnica, y queda en nuestras perspectivas ensayar los efectos del DCA sobre la alodinia mecánica y la reactividad glial en el mismo.

Aunque los datos del comportamiento y la disección mostraron que la cirugía no había sido adecuada, algunos cortes de estos animales con lesión en L5 fueron procesados para inmunofluorescencia contra GFAP, mostrando un aumento del marcador en el asta dorsal ipsilateral a la lesión. Sin embargo, debido a que el ensayo de comportamiento dio lo contrario a lo esperado, no pudo establecerse una relación entre los cambios en el comportamiento de alodinia con los cambios en la gliosis reactiva, por lo cual decidimos no profundizar en los ensayos de inmunohistoquímica e histoquímica en el resto de los tejidos, ni realizar la cuantificación las marcas positivas para GFAP y lectina.

Muchos investigadores se han planteado la pregunta de si es posible considerar a la glia como blanco de terapia para el dolor. Los inhibidores o moduladores gliales más utilizados en distintos modelos de dolor son el fluorocitrato (que bloquea selectivamente el metabolismo de astrocitos y microglia) y el antibiótico minociclina, que inhibiría la activación microglial sin afectar aparentemente a astrocitos y neuronas (Ji y col., 2013). Algunos estudios sugieren que la microglia podría ser más importante en las fases iniciales de dolor, mientras que los astrocitos son más relevantes en la fase posterior de mantenimiento. Hay, por lo tanto, evidencias importantes que apuntan a que la interrupción farmacológica de la activación glial puede producir un efecto anti-nociceptivo en modelos de dolor crónico (McMahon y col., 2005; Echeverry y col., 2008). Sin embargo, es extremadamente difícil diseñar fármacos que se dirijan sólo a las células gliales sin afectar a las neuronas. Además, la eliminación de las células gliales con toxinas selectivas para glías puede causar efectos perjudiciales, dado las funciones de apoyo y protección de las glías (Ji y col., 2013).

En este trabajo planteamos como estrategia, la reversión de la remodelación metabólica que acompaña a la reactividad glial a través de la administración de DCA. Este compuesto representa una alternativa terapéutica a tener en cuenta en esta patología donde existen muy pocas herramientas farmacológicas eficaces. El hecho de que el dicloroacetato haya sido utilizado previamente en seres humanos resulta aún más esperanzador puesto que acorta la brecha entre los estudios preclínicos y clínicos.

En suma, en este trabajo hemos puesto a punto un modelo de dolor crónico inflamatorio para el estudio de alodinia mecánica y la reactividad glial y su modulación con el fármaco DCA. Nuestros resultados sugieren que el DCA puede ofrecer una alternativa terapéutica para el dolor crónico inflamatorio.

8. PERSPECTIVAS

Durante la realización de este trabajo se han generado nuevas interrogantes que sugieren trabajos futuros:

- Repetir los experimentos del modelo de dolor crónico inflamatorio en rata, con la finalidad de aumentar el número de animales y evaluar el efecto del DCA sobre la alodinia mecánica, e incorporar otro test sensorial para analizar la hiperalgesia térmica.
- Repetir los estudios de la reactividad glial espinal en el modelo de dolor inflamatorio en rata dentro de un periodo de tiempo de 14 días post-inyección, de manera de estar más acordes al pico de reactividad que ocurre en el modelo según datos de la literatura. Pretendemos mejorar la evaluación de la microgliosis utilizando inmunofluorescencia para Iba-1, que da un marcado más específico para microglía que la Lectina.
- Utilizar otro modelo de dolor neuropático, como la constricción crónica del nervio ciático, que es una cirugía menos invasiva y ofrece menores dificultades técnicas. Logrado esto podremos evaluar el efecto del DCA.
- Establecer, por medio de respirometría de alta resolución, si los efectos beneficiosos de la administración de DCA, sobre la activación glial y en el comportamiento de alodinia e hiperalgesia, se relacionan con el incremento de la respiración mitocondrial en biopsias de médulas espinales lumbares.
- Analizar los efectos del DCA sobre el patrón de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en ambos modelos de dolor crónico, sobre muestras de médula espinal utilizando técnicas de PCR en tiempo real, y confirmar por western blot.
- Establecer la relación entre los efectos del DCA en la reactividad glial y la actividad neuronal en neuronas presentes en los ganglios de las raíces dorsales lumbares y en el asta dorsal de la médula espinal en ambos modelos, mediante detección de marcadores de actividad neuronal, como por ejemplo c-fos, en los tiempos adecuados que habrá que ajustar.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acarin L, Vela JM, González B and Castellano B. **1994**. Demonstration of Poly-N-acetyl Lactosamine Residues in Ameboid and Ramified Microglial Cells in Rat Brain by Tomato Lectin Binding. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 42: 1033-1041.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS. **2004**. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev*. 47: 263-274.
- Baron R, Binder A, Wasner G. **2010**. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. 9: 807-819.
- Basbaum A, Jessell T. **2000**. La percepción del dolor. En: Kandel E, ed.; Schwartz J, ed.; Jessell T, ed. *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill/Interamericana. 472-491.
- Bennett GJ y Xie YK. **1988**. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33: 87-107.
- CAPRCEIM, **2011**. Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education. Institute of Medicine; Board on Health Sciences Policy. *Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. Washington, DC: The National Academies Press; http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=13172. Consultado octubre 27, 2014.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de Leon A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R. **2008**. Mitochondrial Dysfunction in SOD1G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Journal of Neuroscience*. 28:4115-4122.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. **1994**. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 53: 55–63.
- Clark A, Gentry C, Bradbury E, McMahon S, Malcangio M. **2007**. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *European Journal of Pain*. 11: 223–230.

- Decosterd y Woolf. **2000**. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 87:149–158.
- De Olmos J, Hardy H, Heimer L. **1978**. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol*. Sep 15;181(2):213-44.
- Dixon WJ. **1980**. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 20: 441–62.
- Dworkin RH, Malone DC, Panarites CJ, Armstrong EP, Pham SV. **2010**. Impact of postherpetic neuralgia and painful diabetic peripheral neuropathy on health care costs. *J Pain*. 11(4):360-368.
- Echeverry S, Shi XQ and Zhang J. **2008**. Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain*. 135: 37–47.
- Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnani S, Javan M. **2000**. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *JPharmacol Toxicol Methods*. 43(1):11-4.
- Finnerup NB, Scholz J, Attal N, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Raja NS, Rice ASC, Rief W, Rowbotham MC, Simpson DM, Treede RD. **2013**. European Federation of International Association for the Study of Pain Chapters. Neuropathic pain needs systematic classification. *Eur J Pain*. 17: 953–956.
- Freud J. **1947**. Some aspects of active immunization. *Annu Rev Microbiol*. 1:291–308.
- Fruhstorfer H, Gross W and Selbmann O. **2001**. Von Frey hairs: new materials for a new design. *European Journal of Pain*. 5: 341–342.
- Gómez-Barrios y Tortorici. **2009**. Mecanismos del dolor neuropático: del laboratorio a la clínica. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 28: 2-11.
- Haydon PG. **2001**. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci*. 2: 185–193.
- IASP, International Association for the Study of Pain: <http://www.iasp-pain.org>. Consultado octubre 27, **2014**

- Itoh Y. **2003**. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:4879-4884.
- Ji RR y Berta T, Nedergaard M. **2013**. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?. *Pain*. 154: S10–S28
- Kidd BL y Urban LA. **2001**. Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*. 87: 3–11.
- Kim HY, Chung JM, and Chung K. **2008**. Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: The effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *NIH Public Access*. 447(1): 87–91.
- Kim SH y Chung JM. **1992**. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 50: 355-363
- Kriegstein A y Alvarez-Buylla A. **2009**. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 32:149-184.
- Lobsiger C y Cleveland D. **2007**. Glial cells as intrinsic components of non-cell autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci*. 10: 1355–1360.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. **2005**. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6: 521–532.
- McMahon SB, Cafferty W, Marchanda F. **2005**. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental Neurology*. 192: 444– 462.
- McMahon SB y Malcangio M. **2009**. Current Challenges in Glia-Pain Biology. *Neuron*. 64: 46-54.
- Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Bolatto C, Trías E, Gandelman M, Radi R, Barbeito L, Cassina P. **2012**. Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Plos ONE* 7(4): e34776.
- Molist P, Pombal MA, Megías M. 2011. Técnicas histológicas. *Histoquímica*. En: *Atlas de Histología vegetal y animal*. Disponible en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/5-histoquimica.php>
- Montes MJ, Retamoso I. **2012**. Fármacos en el tratamiento del dolor. En: Montes MJ, Retamoso I, Vázquez C. *El Dolor: un abordaje interdisciplinario*. Zona editorial, p.114-142.

- NACCRAPLA-A. **2009**. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); A, Models of Pain. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32654/> Consultada en diciembre, 2014.
- Obata K, Katsura H, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, and Noguchi N. **2006**. Suppression of the p75 Neurotrophin Receptor in Uninjured Sensory Neurons Reduces Neuropathic Pain after Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience*. 26(46):11974 –11986.
- Parpura V, Verkhratsky A. **2012**. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept. *ASN NEURO* (4):art:e00087.
- Patel MS, Roche TE. **1990**. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J*. 4:3224-3233.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, Lamantia A, Mcnamara J, Williams S. **2008**. *Neurociencia*.3a.ed. Panamericana.
- Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. **2004**. Complete Freund's adjuvant induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci*. 20:467–73.
- Rowland LP, Shneider NA. **2001**. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 344: 1688-700.
- Sandkühler J. 2009. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*. 89:707-58.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. **1990**. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 43: 205-211.
- Skaper SD, Facci L, Giusti P. **2014**. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology*. 141: 314-27.
- Sofroniew MV and Vinters HV. **2010**. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35
- Stacpoole PW, Kerr DS, Barnes C, Bunch ST, Carney PR, Fennell EM, Felitsyn NM, Gilmore RL, Greer M, Henderson GN, Hutson AD, Neiberger RE, O'Brien RG, Perkins LA, Quisling RG, Shroads AL, Shuster JJ, Silverstein JH, Theriaque DW, Valenstein E. **2006**. Controlled clinical trial of

- dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics*. 117: 1519-31.
- Stein C, Millan MJ, Herz A. **1988**. Unilateral Inflammation of the Hindpaw in Rats as a Model of Prolonged Noxious Stimulation: Alterations in Behavior and Nociceptive Thresholds. *Pharmacol Biochem Behav*. 31: 445-451.
- Sui BD, Xu TQ, Liu JW, Wei W, Zheng CX, Guo BL, Wang YY, Yang YL. **2013**. Understanding the role of mitochondria in the pathogenesis of chronic pain *Postgrad Med J*. 89:709-14.
- Tiwari V, Guan Y, Raja SN. **2014**. Modulating the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: promises and potential caveats. *Neurosci Biobehav Rev*. 45: 19-27.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. **2008**. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 70: 1630-1635.
- Von Frey M. **1896**. Ueber den Gebrauch von Reizhaaren. In: Untersuchungen uÈber die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz. *Abhandlungen der thematisch-physischen Classe der Koeniglich Saechsischen Gesellschaft der Wissenschaften*. 23: 208-217. Citado en Fruhstorfer y col 2001.
- Wang DD and Bordey A. **2008**. The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol*. 86:342-367.
- Wen YR, Tan PH, Cheng JK, Liu YC, Ji RR. **2011**. Role of microglia in neuropathic pain, postoperative pain, and morphine tolerance *J Formos Med Assoc*. 110(8): 487-494.
- Xu B¹, Descalzi G, Ye HR, Zhuo M, Wang YW. **2012**. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Mol Pain*. 9:8-15.
- Xu F, Li Y, Li S, Ma Y, Zhao N, Liu Y, Qian N, Zhao H, MD, Li Y. **2013**. Complete Freund's adjuvanteinduced acute inflammatory pain could be attenuated by triptolide via inhibiting spinal glia activation in rats. *Journal of surgical research*. xxx: 1-9.
- Zhuo M, Gongxiong Wu G, WuLJ. **2011**. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Molecular Brain*. 4:31