



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**Incremento de la actividad de quinasa Cdk5 en neuronas sensoriales en un  
modelo de dolor neuropático**

José-Manuel Alejandro Araya Zamora

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile  
2023



**UNIVERSIDAD  
MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**Incremento de la actividad de quinasas Cdk5 en neuronas sensoriales en un modelo de dolor neuropático**

José-Manuel Alejandro Araya Zamora

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutor: Elías Utreras, Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencia.

Co-Tutor: Diego Rojas Rivera, Doctor en Bioquímica.

Santiago - Chile  
2023

*“No existe objetivo más noble que aliviar el dolor  
y el sufrimiento.”*

**Ronal Melzack**

*“(...) El dolor es sentir todo, todo el tiempo.*

*(...) El dolor es un atajo a la humildad.*

*(...) El dolor, aunque es lo peor que hay, te educa y te motiva.”*

**Eial Moldavsky**

## AGRADECIMIENTOS

Empiezo esta lista con lo más importante, agradecer a mi familia, quienes me han dado todas las comodidades, desafíos y apoyo en todo momento para llegar a hasta este punto. Sean eternos por favor.

Agradecer por supuesto a mis compañeros de laboratorio: Camila, Martín, Diego y Pedro, quienes me ayudaron al momento de incorporarme, discutieron conmigo resultados buenos, los no tan buenos y los horribles, así como también me entregaron muchos gratos momentos de risas y distensión.

Agradezco a mis amigos de la vida que me entregan felicidad.

Agradecer a mis compañeros de la uni, especialmente a Ximena, Romina, José, Nicolás, Jaime, Diego, Lucas, las Javieras, Benjamín, Pablo y Sebastián con quienes compartí hermosos momentos de la vida universitaria y nos presionamos sanamente cuando fue necesario.

Agradezco también a la Escuela de Biotecnología de la Universidad Mayor y sus docentes, quienes, a parte de cumplir lo estipulado en el servicio, se dan día a día el tiempo para formar capital humano de excelencia y manteniendo un estrecho y sano contacto con los estudiantes, manteniendo siempre abiertas sus puertas para la comunicación. No me imagino otra forma de hacer academia.

Finalmente, también quiero agradecer a quienes me guiaron en todo momento del proceso de este proyecto, al Dr. Elías Utreras y Dr. Julio Alcayaga, quienes me mostraron que las partes más difíciles del trabajo son también las que van moldeando los procesos que desarrollamos, con paciencia y tolerancia ante errores inevitables para mi aprendizaje. También al Dr. Diego Rojas R. quién siempre mantuvo contacto e interés por mis avances técnicos y personales en el desarrollo de este proyecto. Un agradecimiento especial también al Dr. Elías, quien me incentivó activamente a participar en el XXXIV Congreso de la Sociedad de Biología Celular de Chile, realizado en Puerto Varas, donde pude presentar mi trabajo y recibir todo tipo de comentarios constructivos para mejorar el quehacer científico.

Especial agradecimiento a Biorender.com donde hice los esquemas que presento en este proyecto, y en muchas otras circunstancias.

## INFORMACIÓN DEL LABORATORIO

El Laboratorio de Mecanismos Celulares y Moleculares del Dolor fue fundado en 2011 por el Dr. Elías Utreras, año que ingresó al cuerpo académico del Departamento de Biología. Este laboratorio está ubicado en el cuarto piso del edificio Biología Milenio, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. La investigación del Dr. Utreras ha sido financiada constantemente por fondos gubernamentales tales como:

Proyecto de inserción a la Academia (Investigador insertado, 2011-2013), Fondecyt de Inicio (Investigador principal, 2011-2014), Anillo de investigación en estrés oxidativo del sistema nervioso (Investigador asociado, 2012-2015), Proyecto Enlaces (Investigador principal, 2018-2019), Fondecyt Regular (2019-2023) y por el Proyecto Asociativo Núcleo Milenio para el Estudio del Dolor, MiNuSPain (2020-2023).

MiNuSPain es una Iniciativa Científica Milenio otorgada por ANID del Ministerio de Ciencias, Tecnología, Conocimiento e Innovación del Estado de Chile con el deseo de cumplir con los objetivos generales de la iniciativa como lo son la investigación de excelencia a nivel nacional, cooperación nacional e internacional, formación de capital humano avanzado y la divulgación y transferencia del conocimiento; así como los objetivos específicos del núcleo enfocados en investigar las bases celulares y moleculares del dolor, con especial énfasis en los canales de iones, receptores y vías de señalización involucradas en el dolor neuropático.

## ABREVIATURAS

**AMP:** Adenosine monophosphate.

**ATP:** Adenosine triphosphate.

**AVMA:** American Veterinary Medical Association.

**$\beta$ III-tub:** beta 3 tubulina

**BAX:** Proteína X asociada de Bcl-2.

**BDNF:** Brain Derived Neurotrophic Factor.

**BSA:** Bovine Serum Albumin.

**CaMKII:** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant kinase 2.

**CCI:** Chronic Constriction Injury.

**Cdk5:** Cyclin dependent kinase 5.

**CICUA:** Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales

**COVID-19:** Coronavirus disease

**CREB:** cAMP Response element-binding.

**CRMP2:** Collapsin Response Mediator Protein

**CSG:** Células Satelitales Gliales

**CTCF:** Corrected Total Cell Fluorescence

**DN:** Dolor Neuropático

**EEM:** Error estándar de la media.

**Egr-1:** Early growth response protein 1

**ERK1/2:** Extracellular signal-regulated kinases 1/2s

**EUA:** Estados Unidos de América.

**GFAP:** Glial Fibrillary Acidic Protein

**GRD:** Ganglio de la raíz dorsal

**GS:** Glutamina Sintetasa.

**IASP:** International Association for Study of Pain

**IB-4:** Isolectin-B4

**Iba-1:** Ionized calcium-binding adapter molecule 1

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gama

**IL-18:** Interleuquina 18

**IL-6:** Interleuquina 6

**Entren:** Integrated Density (Densidad Integrada)

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase

**MBP:** Myelin basic protein

**NF200:** Neurofilamento 200

**NFM:** Neurofilamento mediano

**NGF:** Nerve Growth Factor.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**OCT:** Optimal Cutting Temperature compound

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**PFA:** Paraformaldehido

**PICUA:** Programa institucional de cuidado y uso de animales

**Pi-RNA:** ARN asociados a Piwi

**PKA:** Protein kinase A

**PKC:** Protein kinase C

**p-TRPV1:** fosfo-TRPV1

**ROS:** Reactive oxygen species

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNP:** Sistema nervioso periférico

**GT:** Ganglio Trigeminal

**GTF- $\beta$ 1:** Transforming Growth Factor Beta 1

**TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alpha

**TrkA:** Tropomyosin receptor kinase A

**TRPV1:** Transient receptor potential vanilloid 1

**TRPV1<sup>T407A</sup>:** TRPV1 mutado en treonina 407 por alanina.

## I. INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
INFORMACIÓN DEL LABORATORIO.....	5
ABREVIATURAS.....	6
I. INDICE.....	2
II. RESUMEN .....	4
III. SUMMARY .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. EL DOLOR Y SU RELEVANCIA: .....	6
1.2. FISIOANATOMÍA DEL DOLOR: .....	7
1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DOLOR: PROTEÍNAS DE MEMBRANA, QUINASAS Y MEDIADORES INFLAMATORIOS. ....	10
1.4. CDK5 EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE DOLOR.....	11
1.5. CDK5 EN DOLOR NEUROPÁTICO .....	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
2.1. Hipótesis:.....	16
2.2. Objetivo general:.....	16
2.3. Objetivos específicos (OE).....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Materiales: .....	17
3.1.1. Animales:.....	17
3.1.2. Material quirúrgico.....	17
3.1.3. Anticuerpos y reactivos.....	17
3.1.4. Soluciones.....	18
3.1.5. Equipos y espacios.....	19
3.2. Métodos .....	19

3.2.1.	Constricción crónica del nervio ciático.....	19
3.2.2.	Extracción de GRD, nervio ciático y médula espinal .....	21
3.2.3.	Inmunofluorescencia de tejidos.....	21
3.2.4.	Análisis cuantitativo de las IF .....	23
3.2.5.	Análisis estadístico .....	23
3.2.6.	Ética.....	23
4.	PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	24
4.1.	Análisis de la morfología y los distintos tipos celulares presentes en los GRD (L3-L6) de ratón. 24	
4.2.	La ligación del nervio ciático produjo una disminución de la masa corporal y aumentó la expresión de los marcadores de inflamación TNF-a y GFAP en los GRD de ratón.....	27
4.3.	La ligación del nervio ciático aumentó la expresión de Cdl5, p35 y la actividad de Cdk5 en los GRD de ratones. ....	29
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	31
6.	CONCLUSIONES .....	36
7.	IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS.....	37
8.	REFERENCIAS.....	38
9.	ANEXOS .....	53



## II. RESUMEN

El dolor es un fenómeno sensorial y emocional complejo que está relacionado con un daño tisular real o potencial. El dolor neuropático, es un tipo de dolor recurrente y difícil de tratar que es reconocido como aquel generado por enfermedades o lesiones en el sistema nervioso. La nocicepción es un complejo proceso neuronal que incluye: el reconocimiento y transducción de los estímulos dañinos por diversos nociceptores (receptores-canales) expresados en superficie de las aferentes neuronales. Además, estos estímulos son transmitidos como impulsos nerviosos hacia la médula y el cerebro donde ocurre la modulación y la percepción del dolor. En estos procesos participan varias proteínas quinasas y fosfatasas. En particular, la quinasa Cdk5 participa en las vías de señalización del dolor mediante la fosforilación de varios receptores canales, como TRPV1 y P2X2R, disminuyendo su umbral de activación y por ende la sensibilización periférica. En modelos animales de dolor neuropático (DN) se ha reportado que la actividad de Cdk5 por el incremento de la expresión de su activador p35. Sin embargo, no está del todo clara la función molecular de Cdk5 en DN. En esta tesis se evaluó la expresión y actividad de Cdk5 en los ganglios raquídeos de ratón, luego de una ligación del nervio ciático por 7 días. Mediante análisis de inmunofluorescencia se determinó que la ligación de nervio ciático indujo una respuesta inflamatoria, aumentó la expresión de Cdk5, p35 y la fosforilación de TRPV1 mediada por Cdk5 en los somas de las neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos que forman el nervio ciático, con respecto al lado contralateral sin ligar. En conjunto estos resultados demuestran que Cdk5 incrementa su función de neuronas sensoriales durante el DN y, además, sugieren que la función de Cdk5 podría ser un futuro blanco terapéutico para este tipo de dolor.

### III. SUMMARY

Pain is a complex sensory and emotional phenomenon that is related to actual or potential tissue damage. Neuropathic pain is a type of recurrent and difficult-to-treat pain that is recognized as that generated by diseases or injuries to the nervous system. Nociception is a complex neural process that includes: recognition and transduction of harmful stimuli by various nociceptors (receptors-channels) expressed on the surface of neuronal afferents. Furthermore, these stimuli are transmitted as nerve impulses to the spinal cord and brain where pain modulation and perception occur. Several protein kinases and phosphatases participate in these processes. In particular, the Cdk5 kinase participates in pain signaling pathways by phosphorylating various receptor channels, such as TRPV1 and P2X2R, lowering their activation threshold and therefore peripheral sensitivity. In animal models of neuropathic pain (NP) it has been reported that the activity of Cdk5 is increased by increasing the expression of its activator p35. However, the molecular function of Cdk5 in NP is not entirely clear. In this thesis, the expression and activity of Cdk5 was evaluated in the spinal ganglia of mice, after a sciatic nerve ligation for 7 days. Immunofluorescence analysis shows that ligation of the sciatic nerve induced an inflammatory response, plus the expression of Cdk5, p35, and Cdk5-mediated phosphorylation of TRPV1 in the somas of the sensory neurons of the dorsal root ganglia that form the sciatic nerve, with relative to the contralateral unligated side. Taken together, these results show that Cdk5 increases the function of sensory neurons during NP and, furthermore, suggests that Cdk5 function could be a future therapeutic target for this type of pain.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL DOLOR Y SU RELEVANCIA:

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define el dolor como “Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial” (1). Esta experiencia es de carácter consciente (2) y multidimensional, ya que se estructura desde un carácter sensorial-discriminativo, afectivo-motivacional y cognitivo-evaluativo (3). El dolor puede ser agudo, reconociéndose por la utilidad de advertir al individuo de amenazas o lesiones en el cuerpo, dadas por estímulos como lesiones, enfermedades, traumas o procedimientos médicos(4). También puede ser crónico, el cual perdura por más de 3 meses, sin la utilidad mencionada anteriormente para el individuo(5,6). El dolor crónico se puede clasificar en primario y secundario. Por un lado, el dolor crónico primario presenta distrés emocional, discapacidad disfuncional y no puede ser explicado por otro fenómeno; por ejemplo, la fibromialgia, la migraña crónica o el dolor de espalda, son padecimientos de este tipo, entre otros. El dolor crónico secundario, en cambio, es cuando es un signo de una enfermedad previa, como el cáncer, el dolor post-quirúrgico o post-traumático (7). En general, el dolor crónico afecta alrededor del 18% de las personas en países en desarrollo (8) y se ha reportado que asciende a 32% de la población en Chile, enfocado en la población más activa económicamente, siendo de carácter no-oncológico y de origen musculoesquelético u osteoarticular que afectan, además, la calidad de vida en ámbitos socioeconómico, productivos y provocando el retiro anticipado del mundo laboral de quienes lo padecen (9–11).

Según los mecanismos etiológicos, el dolor se puede clasificar en nociceptivo, inflamatorio o neuropático (12–15). El dolor nociceptivo es aquel que se percibe por una activación normal de las fibras nerviosas nociceptivas cuando ocurre una lesión en la piel, los músculos, los tejidos blandos o los huesos y suele ser bien localizado, cumpliendo la función de alarmar al individuo (14,15). El dolor inflamatorio, ocurre cuando las heridas, reacciones autoinmunes o infecciones generan el reclutamiento células inmunes y liberación de mediadores inflamatorios que gatilla la reducción los umbrales de activación de los nociceptores, cumpliendo también un rol protector para permitir la regeneración de tejidos (15). Sin embargo, el dolor neuropático (DN) es aquel generado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP) (16). Particularmente, la etiología del DN incluye lesiones nerviosas generadas por trauma o enfermedades inflamatorias, metabólicas o virales, así como la disfunción de neurotransmisores o neurotoxicidad (17,18).

La prevalencia del DN se estima entre un 7% y 10% de la población mundial, con especial énfasis en mujeres y mayores de 50 años (19), siendo un importante problema de salud pública (20). De hecho, algunas personas con diabetes evidencian DN en las extremidades distales en estados avanzados de la enfermedad, lo que se conoce como polineuropatía diabética dolorosa (21,22). Los análisis transcriptómicos realizados a biopsias humanas de pacientes con esta polineuropatía muestran un incremento en marcadores de la respuesta inmune y una disminución del número de neuronas periféricas, disminuyendo así también la expresión de canales iónicos, factores de transcripción neuronales y quinasas (23). Por otro lado, un estudio en Chile demostró que pacientes pediátricos con quemaduras también presentan DN, con un importante factor emocional que afecta su calidad de vida, asociándolo con depresión, negativo impacto psicomotor, limitada participación social y exclusión social (24). Por su parte, otro estudio en Chile indica que hay una prevalencia del 20% de DN derivados de trastornos temporomandibulares (25). Actualmente, se ha comprobado que personas convalecientes de COVID-19 también presentan DN (26,27). Para finalizar, recientemente, se realizó el primer reporte de prevalencia de dolor crónico no oncológico en Chile, que indica que el 12% de la población entre 38 y 74 años sufre DN, asociándose a mujeres, menos años de escolaridad, síntomas depresivos, diabetes y obesidad (11).

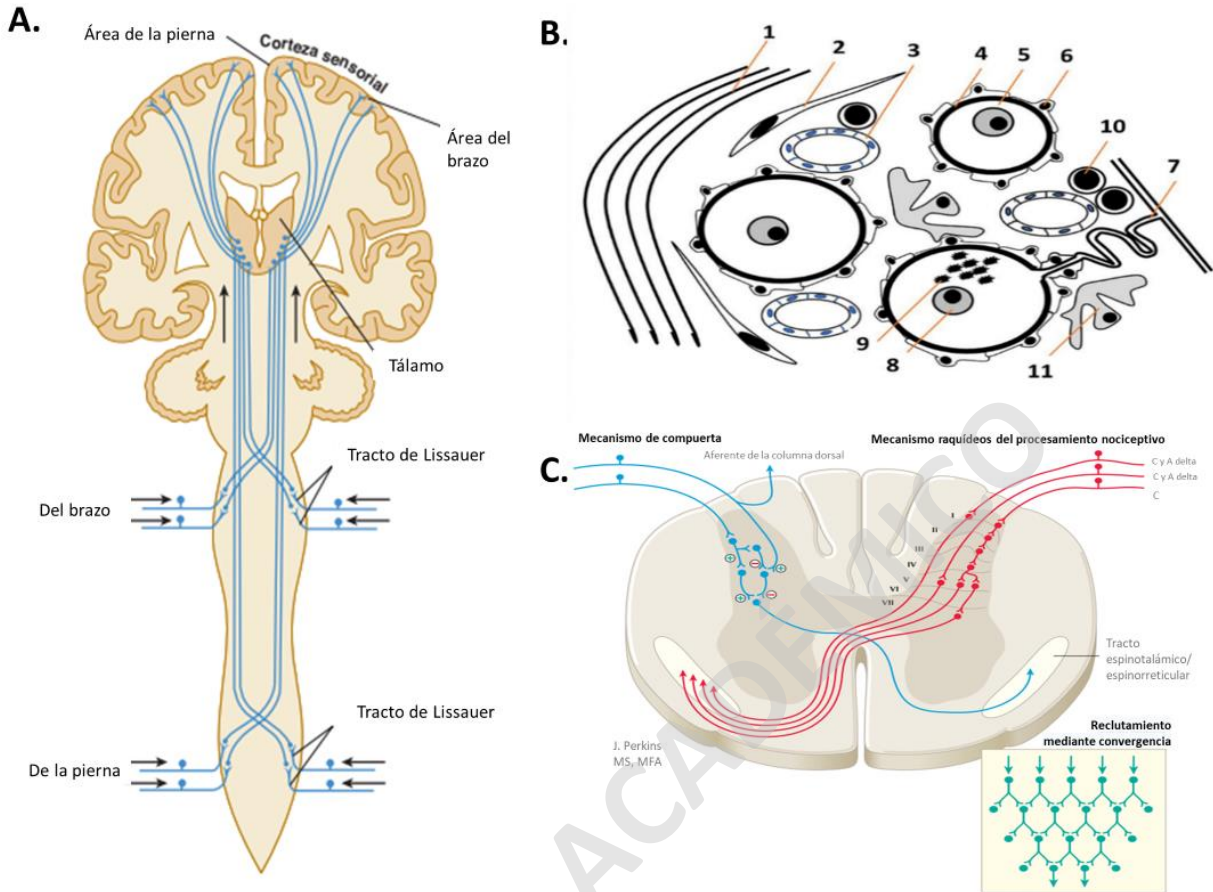
## **1.2. FISIOANATOMÍA DEL DOLOR:**

Los estímulos dolorosos son detectados por el sistema somatosensorial (**Figura 1**), compuesto principalmente por neuronas del SNP y SNC, las cuales expresan distintos receptores en su superficie. Las neuronas sensoriales periféricas ubicadas en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) (**Figura 1A**) y en los ganglios trigeminales (GT) expresan receptores de dolor (nociceptores), de tacto grueso, de temperatura y de presión. De esta forma, detectan estímulos sensoriales y dolorosos en el cuerpo y la cara, respectivamente (28–30). Los GRD contienen los somas de las neuronas de primer orden y varios tipos de células no neuronales como las células satelitales gliales (CSG), células de Schwann, tejido vascular, tejido conectivo circundante, células inmunes, entre otras (31) (**Figura 1B**). Las neuronas sensoriales se caracterizan por tener una morfología pseudo-unipolar, con un axón que se divide en una rama periférica que inerva los órganos internos y la piel, y una rama central que inerva el asta dorsal de la médula espinal, realizando sinapsis con neuronas de segundo (31,32).

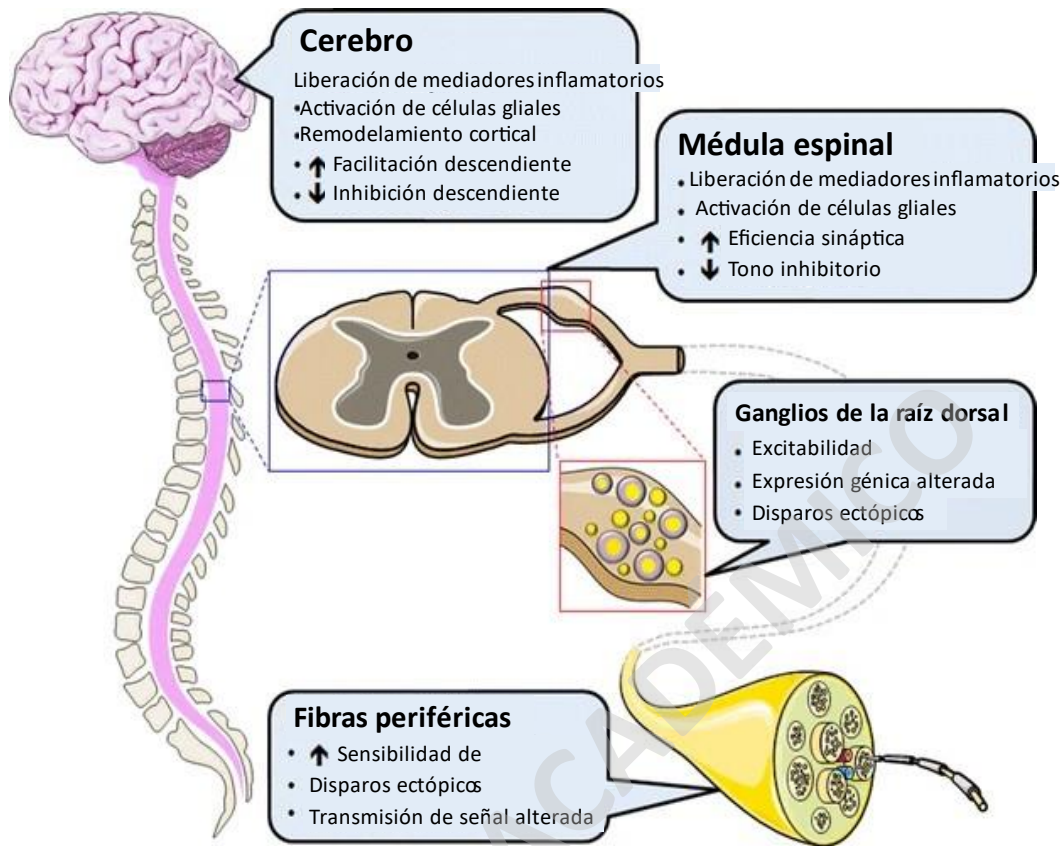
Los axones de las neuronas sensoriales primarias pueden formar paquetes de fibras nerviosas de distinto grosor ( $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\delta$  y C). Dependiendo de la cantidad de mielina y del grosor de estas fibras, las velocidades de conducción de impulsos eléctricos son muy variadas. Así, las fibras de tipo  $A\alpha$  y  $A\beta$  son

las más rápidas y están encargadas de la propiocepción. Por su parte, las fibras A $\delta$  están levemente mielinizadas y transmiten rápido la información dolorosa hacia el SNC. Por último, las fibras C no poseen mielina y transmiten la información dolorosa mucho más lento (**Figura 1C**). Las neuronas primarias pueden transducir diversos estímulos de presión (barorreceptores), temperatura (termorreceptores) o sustancias químicas (quimiorreceptores), incluso ser de carácter poli-modales como los nociceptores (30). Estas neuronas pueden, además, ser clasificadas dependiendo de los neurotransmisores que secretan en neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas (33), o según los canales iónicos que expresan (34–39). Análisis transcriptómicos, amplían aún más esta rama de la sistemática de poblaciones neuronal (40,41). Con respecto a la fisiología del dolor, las neuronas primarias **transducen** la información sensorial y nociceptiva en impulsos eléctricos (2), luego son **transmitidos** mediante potenciales de acción que viajan por los axones hasta realizar sinapsis con las neuronas de segundo orden, localizadas en las láminas de la asta dorsal de la médula espinal (3,42). Esta información asciende a regiones del cerebro donde ocurre la **percepción** del dolor y, a su vez, se activan neuronas en centros específicos del tronco encefálico, las que **modulan** en la médula espinal la información nociceptiva que asciende hacia el cerebro (3,28,43).

Durante el DN ocurren ciertas modificaciones funcionales en los GRD. En primer lugar, los pacientes con DN experimentan ardor, descargas eléctricas o estímulos punzantes, que pueden ser incluso espontáneos (44). También, pueden presentar dos fenómenos: la *hiperalgesia*, que es un incremento en la intensidad del dolor frente a estímulos dolorosos (45) y la *alodinia*, definido como una sensación anormal de estímulos inocuos que provocan dolor (46,47). Estos signos que caracterizan al DN son provocados por un aumento en la sensibilización periférica y central (48), la cual es generada por un incremento en los impulsos nerviosos debido a cambios en la permeabilidad del calcio y otros cationes, por la sobreexpresión de receptores en membrana o por la modificación de las conexiones sinápticas que se pueden generar (16,42,43,49).



**Figura 1:** Anatomía del sistema somatosensorial. **A.** Sistema ventrolateral, que posee los tractos espinotalámicos para dolor y temperatura (28). **B.** Un esquema de la constitución celular de GRD humano (31): en 1. tejido conectivo, 2. fibroblastos, 3. capilares, 4. membrana basal, 5. espacio interneuronal, 6. células satelitales gliales, 7. proceso pseudo-unipolar, 8. núcleo, 9. acumulaciones de lipofusina, 10. Linfocitos T & B, 11. Macrófagos. **C.** Interacción de aferentes primarias con neuronas de segundo orden de la médula espinal (39); en azul “mecanismos de compuerta”, rojo “Mecanismos raquídeos del procesamiento nociceptivo” y en verde “Reclutamiento mediante convergencia” (43).



**Figura 2:** Modificaciones morfológicas de las neuronas en cuadro de dolor neuropático(45). Modificaciones fisiológicas de las neuronas en DN (49), en el cerebro: Liberación de mediadores inflamatorios, activación de microglías, remodelamiento cortical, disminución de inhibición y aumento de facilitación; en la médula: ídem; en GRD: aumento de excitabilidad, expresión génica alterada y disparo ectópico; en nervios periféricos: aumento de actividad nociceptiva, transmisión de señal alterada y disparo ectópico.

### 1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DOLOR: PROTEÍNAS DE MEMBRANA, QUINASAS Y MEDIADORES INFLAMATORIOS.

Las lesiones en un organismo pueden provocar la liberación de mediadores inflamatorios, produciendo una “sopa inflamatoria”, que contiene sustancias que aumentan en la sensibilización de nociceptores, como proteasas, ATP, cationes y citoquinas generadas por células inmunes (50), entre otras moléculas. Estos mediadores inflamatorios pueden regular, además, la actividad de las CSG observado por un aumento en la expresión del filamento intermedio GFAP (51,52), y el reclutamiento de macrófagos (53,54).

La actividad de las neuronas nociceptivas se basa en la estimulación de receptores y canales iónicos que permiten la permeabilización de iones, como el calcio, sodio o potasio, que son importante para la iniciación y mantención de los impulsos nerviosos. Así lo han demostrado diversas investigaciones, donde se asocia el dolor a la actividad de receptores-canales purinérgicos P2X2 y P2X3 (34,36,55), canales catiónicos no selectivos como TRPV1 (35,56,57) y canales catiónicos dependientes de voltaje, entre otros (37,57–60). Además, procesos inflamatorios y de daño provocan la activación de proteínas quinasas en las neuronas primarias y secundarias, que a su vez fosforilan diversos canales-receptores, disminuyendo su umbral de activación y, subsecuentemente, aumentan los procesos de sensibilización periférica y central. Las quinasas más estudiadas en estos procesos son ERK1/2 (61), MAPKs p38 (62) y JNK (63), PKA (64), PKC (65), CaMKII (66) y recientemente la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) (67).

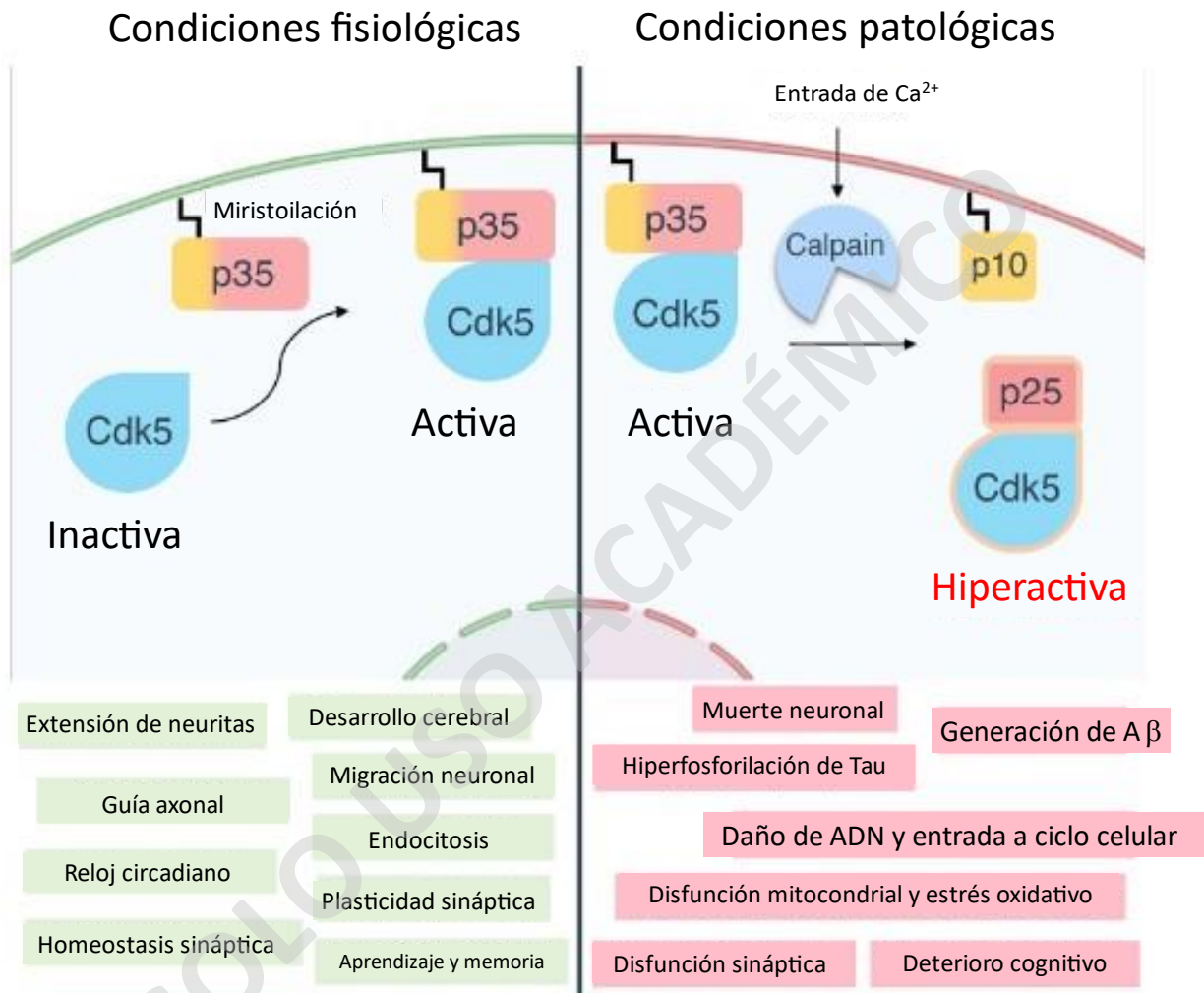
#### **1.4. CDK5 EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE DOLOR:**

Cdk5 es una proteína quinasa que pertenece a la familia de las quinasas dependientes de ciclina y que fosforila residuos de serina o treonina, dirigidos por prolina. Se expresa ubicuamente y aunque sola es inactiva, se ha observado que la expresión de sus activadores, p35 y p39, se restringen predominantemente a neuronas del al sistema nervioso. Cdk5 participa en varios procesos fisiológicos en el SNC (**Figura 3**, lado izquierdo); por ejemplo, la cognición, la plasticidad sináptica, la sobrevida neuronal (68) y los ciclos circadianos, entre otros procesos (69). De esta manera, el complejo Cdk5/p35 participa en neuronas pre-sinápticas regulando, principalmente, la entrada de calcio y liberación de neurotransmisores (70,71), mientras que en neuronas post-sinápticas este complejo participa incrementando la función de receptores de tipo NMDA y regula el mantenimiento de las espinas dendríticas para sensibilizar las neuronas (71–73). Por su parte, Cdk5 también participa en las vías de señalización del dolor, sensibilizando directa e indirectamente las neuronas a través de la disminución de los umbrales de activación de potenciales de acción (23,67–71,74–81). También se ha observado que Cdk5 participa en tejido no neuronal, como por ejemplo en la respuesta inmune, la regulación de insulina, la biología del desarrollo y la oncogénesis (79).

Por otro lado, Cdk5 participa en varios procesos patológicos debido al aumento de su actividad quinasa. El activador de Cdk5, p35, posee un sitio de Miristoilación que permite anclar p35 y Cdk5 a la membrana plasmática. En condiciones patológicas, como un aumento del calcio intracelular, se activa una proteasa llamada calpaína que proteoliza p35 en p25 (68). De esta manera, p25 causa una prolongada activación de Cdk5 y una deslocalización hacia el citoplasma del complejo Cdk5/p25 (82,83), remodelando



inadecuadamente el cito-esqueleto (84). Así, Cdk5 incrementa el estado fosforilado de distintos sustratos que contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson (85), Alzheimer (86), Esclerosis (87), así como en procesos de estrés (tanto oxidativo como mitocondrial), tauopatías y demencia en pacientes VIH positivo (68,79).



**Figura 3:** Roles fisiológicos y fisiopatológicos de Cdk5. A la **izquierda** se observa que en condiciones fisiológicas Cdk5 se activa, uniéndose a p35 para regular la homeostasis del desarrollo neuronal y cognitivo. A la **derecha**, podemos observar como el complejo Cdk5/p35 se desprende de la membrana debido a la proteólisis impulsada por un influjo de calcio y ejecutada por calpaína, hiper activando Cdk5 junto a p25 y generando un desequilibrio con diversas consecuencias a nivel molecular, celular y cognitivo. Copiado y traducido desde Pao & Tsai (2021) (68).

Por su parte, se ha demostrado que diversos mediadores inflamatorios como neurotrofinas (NGF, BDNF) y citoquinas (IL-6, INF- $\gamma$ , IL-18, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1), aumentan la actividad quinasa de Cdk5 en neuronas a través del aumento transcripcional de p35. Estas moléculas inflamatorias aumentan la vía MAPK (MEK1/2- ERK1/2) conocida como la vía canónica de activación de Cdk5. Esta activación provoca el aumento en la expresión del factor de transcripción de Egr-1, que se une al promotor de p35, induciendo su expresión (67,75,81). Nuestro grupo demostró que TNF- $\alpha$  activa la vía de señalización MEK1/2-ERK1/2-Egr-1, incrementando los niveles de p35 y, consecuentemente, la actividad de Cdk5 en líneas celulares derivadas de neuroblastoma y en neuronas sensoriales trigeminales (70,75). Adicionalmente, se demostró que Cdk5 fosforila el canal TRPV1 en la treonina 407, provocando una mayor entrada de calcio en neuronas de los GRD y GT (70,78). Por otro lado, la activación de Cdk5 incrementó los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en líneas celulares y en cultivos primarios de neuronas del GT y GRD (88). Así mismo, TGF- $\beta$ 1 aumentó la activación de Cdk5, causando un incremento en la fosforilación de TRPV1 y la entrada de calcio en cultivos primarios de GRD (76). En líneas celulares de tipo odontoblastos, TGF- $\beta$ 1 también aumentó la activación de Cdk5, sugiriendo la participación de Cdk5 en el dolor dental (77). Por otra parte, Cdk5 fosforila el canal purinérgico P2X2, específicamente la isoforma P2X2a en líneas celulares y en neuronas trigeminales. Esta fosforilación disminuyó la sensibilización de los homotrímeros (P2X2R) y de los heterotrímeros (P2X2/3R) aumentando el influjo de calcio intracelular (74). Por último, se demostró que Cdk5 activa los mecanismos del dolor inflamatorio a través de la vía neuronal *Cdk5-Sinaptofisina-SNARE* en ratas (89).

#### **1.5. CDK5 EN DOLOR NEUROPÁTICO:**

Varios reportes han demostrado la participación directa e indirecta de Cdk5 en algunos mecanismos involucrados en DN (71–73,81,90–93). Por ejemplo, Cdk5 fosforila a CRMP2 (Ser522), un importante regulador de la interacción de proteínas en neuronas sensoriales luego de una lesión nerviosa en ratas (72). Cdk5 también fosforila canales de calcio dependientes de voltaje tipo T, regulando su localización en axones espinales luego de una constricción crónica del nervio espinal en ratas (90,91). Similarmente, se reportó una distribución diferencial de Cdk5 y de canales de calcio activados por voltaje luego de una ligación de los nervios espinales L5 y L6 de ratas lo que causó alodinia (73). Adicionalmente, se ha evidenciado que Cdk5 regula la localización en de los receptores NMDA, en particular permitiendo la expresión de la subunidad NR2A (94), y de los canales de calcio tipo P/Q (71), causando una sensibilización central. Importantemente, se ha demostrado que Cdk5 participa en la regulación de las sinapsis (71,94), favoreciendo los procesos de la sensibilización central y periférica (90–92,95). Por

último, Cdk5 interactúa con la proteína básica de mielina (MBP), sugiriendo que la fragmentación de MBP y su efecto inductor de dolor depende de Cdk5 (93).

Actualmente, las terapias farmacológicas para combatir el DN se han basado en compuestos con severos efectos secundarios como la morfina(81), antidepresivos tricíclicos, inhibidores para receptores de serotonina o norepinefrina, compuestos de unión a canales de calcio o sodio, compuestos canábicos y antiinflamatorios (18,42,48,73,96). Experimentalmente, Cdk5/p35 y sus sustratos son candidatos de potenciales blancos terapéuticos contra el DN(70,74,97–100). Por ejemplo, la inhibición farmacológica de Cdk5 con roscovitina, una molécula que se une al sitio de unión de ATP de Cdk5 (y de otras ciclinas), podría disminuir el comportamiento doloroso en modelos murinos. Así, en el futuro se podría utilizar de manera segura, efectiva y con menos efectos secundarios perjudiciales para lidiar con enfermedades renales, virales, parasitarias, neurodegenerativas, cáncer y trasplantes en los pacientes que las padezcan (70,74,96,97,101). Interesantemente, nuestro grupo demostró que resveratrol, un polifenol de origen natural con propiedades antiinflamatorias y analgésicas, disminuye la transcripción de p35 mediada por TNF- $\alpha$ , disminuyendo así la actividad de Cdk5 en líneas celulares y neuronas del GRD (100). Por su parte, un oligopéptido sintético que se une al complejo hiperactivo Cdk5/p25 ha logrado prevenir la citotoxicidad generada por acumulación de péptidos  $\beta$ -amiloides o de la proteína *tau* en neuronas (67,79). Estos antecedentes muestran que la regulación de la actividad de Cdk5 serviría para combatir padecimientos y enfermedades.

Para estudiar el DN se han usado distintos modelos murinos (102–104). Los ratones son un buen modelo de estudio ya que son mamíferos de fácil mantención y similares a los humanos (105). Anatómicamente difieren en la cantidad de los DRG torácicos y lumbares que poseen respecto a los humanos (28,105,106). Sin embargo, una lesión por constricción crónica (CCI, por sus siglas en inglés) por ligación del nervio ciático en ratones simula comportamientos dolorosos como alodinia, hiperalgesia y dolor espontáneo similares a las lesiones presentes en personas (101,107–110). También hay otros modelos que sirven para analizar distintas secciones del sistema somatosensorial, como el aplastamiento del nervio óptico (97), ligación del nervio espinal (73,90,111,112) o del nervio infra-orbitario (113) y axotomía de nervio ciático (114), entre otras. Además de los métodos físicos de daño, también hay métodos químicos que inducen DN (104), donde podemos encontrar inducción de diabetes mellitus tipo 1 inducida por la droga streptozotocina, un antibiótico y anticancerígeno que destruye las células  $\beta$  del páncreas (115,116). También están aquellos inducidos por fármacos utilizados clínicamente contra cáncer(117–119) y que producen sensibilidad térmica como la vincristina (117), o

disminución en la velocidad de conducción de fibras sensoriales y transporte de neuropéptidos por la acción de cisplatino(119), lo que también ocurre por acción del oxaliplatino que tiene como principal blanco neurotóxico el GRD, donde se observó la disminución del tamaño celular de las neuronas, disminuyendo así la conducción de impulsos nerviosos (118). Los fármacos que se utilizan contra el VIH también presentan efectos secundarios como DN, por lo que también se estudia cómo modelo (120). Finalmente, también están los modelos genéticos, como los utilizados para estudiar la neuropatía periférica diabética (115) o de epidermólisis bullosa distrófica recesiva (121). Esto con la finalidad de ver comportamiento (109,122), aproximaciones farmacológicas (123–125) y mecanismos moleculares que subyugan el DN (23,67–71,74–81,101,126).

Para concluir, es notorio la baja cantidad de estudios y artículos que hay en las bases de datos acerca del SNP respecto al SNC. De hecho, en PubMed, utilizando las palabras clave “Peripheral Nervous System” y “Central Nervous System” podemos observar que los estudios dedicados al SNP no alcanzan ni a un tercio de los resultados para el SNC (516.345 respecto a 1.6617.529 resultados, a diciembre de 2022). Considerando estos antecedentes en conjunto, quisimos retomar las características de los GRD y evaluar la expresión de Cdk5/p35 y su actividad quinasa en los GRD luego de una ligación del nervio ciático en ratones.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis:

La constricción crónica del nervio ciático induce aumento de la actividad de Cdk5 en neuronas de los GRD (L3-L6) de ratones.

### 2.2. Objetivo general:

Evaluar el efecto de una ligación del nervio ciático de ratones sobre la expresión de Cdk5/p35 y su actividad quinasa en neuronas de los GRD.

### 2.3. Objetivos específicos (OE):

**OE1:** Caracterizar la cito-arquitectura de los GRD de ratón mediante inmunofluorescencia.

**OE2:** Evaluar los efectos de la ligación del nervio ciático mediante evaluación de masa corporal del individuo e inmunofluorescencias con marcadores de inflamación en tejido nociceptivo de ratón.

**OE3:** Evaluar la expresión de Cdk5/p35 y la actividad de Cdk5 en tejido nociceptivo de ratón luego de la ligación del nervio ciático.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales:

##### 3.1.1. Animales:

Se utilizaron ratones del background genético C57/FVB, de ambos sexos y entre 6 y 12 meses de edad. Estos ratones fueron trasladados desde el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile al Laboratorio de Mecanismos Celulares y Moleculares del Dolor, ubicado en el edificio Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El transporte fue en jaulas opacas acolchadas con virutas de papel, mientras que su incubación en el laboratorio se realizó en jaulas cerradas de 25x20x15 cm (largo x ancho x alto), acolchados con virutilla de papel compacta y con régimen alimentario *ad libitum*, enriquecimiento ambiental, temperatura y humedad ambiental. Las horas de luz y oscuridad según hora local de Santiago, Chile.

##### 3.1.2. Material quirúrgico:

El equipamiento y materiales que se utilizaron para la ligación del nervio ciático incluye una cámara de inducción, una placa termorregulada. La apertura y exposición del nervio ciático se realizó con material quirúrgico estéril compuesto por un escarpelo, dos pinzas tweezers, una tijera y una micro tijera Vannas, hilo de seda 6-0 e hilo de seda para sutura 3-0 (107,127).

##### 3.1.3. Anticuerpos y reactivos:

Anticuerpos utilizados en esta tesis están recopilados en la **Tabla 1**. Anticuerpo para  $\beta$ III-tubulina (ratón) fueron obtenidos desde Promega Corporation (WI, EUA). Para Cdk5, p35, p39 (conejo), MBP y  $\beta$ III-tubulina (ratón) fueron obtenidos desde Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA). Para TRPV1 (cabra), Cdk5 (ratón), p35 (cabra) fueron obtenidos desde Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, EUA). Cdk5 Invitrogen (conejo) fue obtenido desde Thermo Scientific (IL, EUA). CGRP (ratón) y TNF- $\alpha$  (conejo) fue adquirido desde Abcam (MA, EUA). CFAP (ratón) fue obtenido desde Neuromab (CA, EUA). IB4 y GS (conejo) se obtuvo desde Merck (Alemania). NFM, NF200, NeuN,  $\beta$ III-tubulina (pollo) fueron adquiridos desde Aves Labs (CA, EUA). TRPV1 (conejo) se adquirió por Alomone (Israel). p-T407-TRPV1 (conejo) se generó con anterioridad a pedido (128).

**Tabla 1.** Información de los anticuerpos y reactivos utilizados.

Primario	Especie	Marca	N° catálogo	Dilución
βIII-tubulin	Pollo	AVES Labs	#TUJ	1:1000
βIII-tubulin	Ratón	Promega	#G712A	1/1000
CGRP	Ratón	Abcam	#ab81887	1:1000
GFAP	Ratón	Neuromab	#75-240	1:300
GS	Conejo	Sigma	#G2781	1:500
MBP D8X4Q	Conejo	Cell Signaling	#78896P	1:50
NeuN	Pollo	AVES Labs	#NUN	1:1000
NF200	Pollo	AVES Labs	#NFH	1:500
TNF-α	Conejo	Abcam	#ab34674	1:200
p35	Conejo	Cell Signaling	#2680S	1:50
p35 A18	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	#SC-31102	1:50
Cdk5 1H3	Ratón	Cell Signaling	#12134S	1:100
Cdk5 DC17	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	#sc-249	1:100
VR1 P19	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	#sc-12498	1:50
P2X2R	Conejo	Alomone	#APR-003	1:1000
TRPV1	Conejo	Alomone	#ACC-030	1:200
p-T407-TRPV1	Conejo		A pedido	1:100
TRPA1	Conejo	Alomone	#ACC-037	1:250
<b>Secundario</b>				
AlexaFluor™ Conejo 488	Burro	Invitrogen	#A21206	1:500
AlexaFluor™ Raton 546	Burro	Invitrogen	#A10036	1:500
AlexaFluor Cabra 546	Burro	Invitrogen	#A11056	1:500
AlexaFluor Cabra 647	Burro	Invitrogen	#A21447	1:500
AlexaFluor Pollo 633	Burro	Invitrogen	#A21103	1:500
<b>Otros</b>				
DAPI (1 mg/mL)		ThermoFisher Scientific	#PIEN62248	1:1000
IB4		Sigma	#L3895	1:300
FluorSave™ Reagent		Millipore	#345789	1

### 3.1.4. Soluciones:

Se utilizó una solución isotónica de PBS 1x filtrado en filtros de 70 μm para mantener las biopsias. Esta solución más BSA al 1% y tritón X100 al 0.3%, se utilizó para bloqueo y permeabilización de los tejidos. Esta misma solución se tomaron alícuotas de volúmenes menores para agregar anticuerpos en la razón indicada.

Las soluciones orgánicas para el procesamiento de tejidos fueron PFA 4% y sacarosa 30%. La dilución de fármacos se realizó en suero fisiológico.

### 3.1.5. Equipos y espacios:

Los equipos utilizados en esta tesis fueron un micrótopo crióstato Microm HM5215 (Thermo Fisher Scientific, Alemania), un microscopio confocal Zeiss LSM 710 (Zeiss, Alemania) de la Unidad de Microscopía Avanzada, Depto. de Biología, Universidad de Chile. Los equipos utilizados en la ligación corresponden al Laboratorio del Dr. Julio Alcayaga, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los ratones fueron cruzados y mantenidos en el bioterio central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Una vez llegado a adultos los animales fueron trasladados a la Unidad de Mantenimiento Animal del laboratorio en la Facultad de Ciencias. La sala de cirugía fue en un espacio del laboratorio de fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. La eutanasia y biopsias fueron obtenidas en la zona limpia del laboratorio, separados de la unidad de mantenimiento animal.

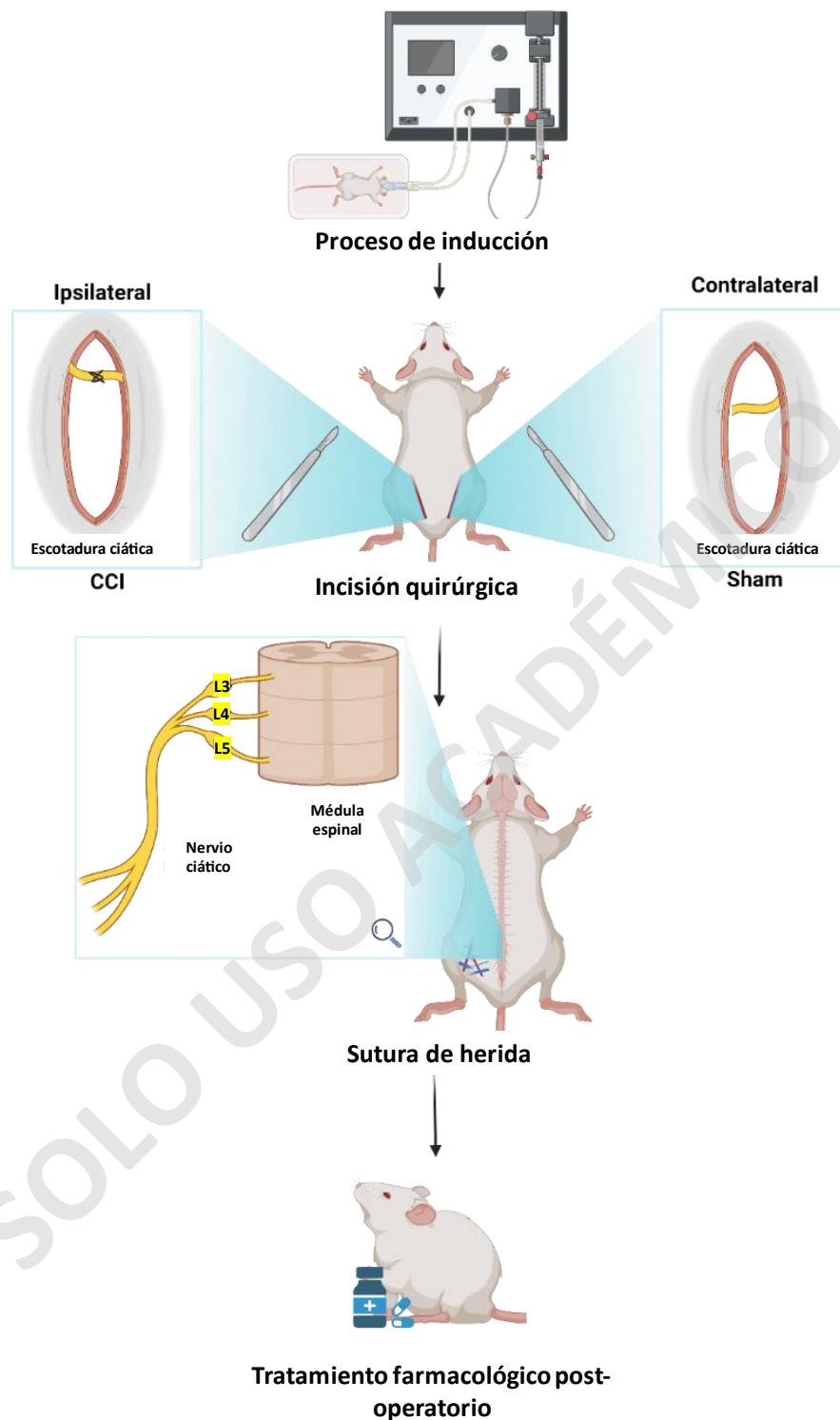
## 3.2. Métodos:

### 3.2.1. Constricción crónica del nervio ciático:

La CCI se realizó mediante una ligación parcial (~50% del grosor inicial) del nervio ciático guiado en principio por el modelo de Bennett & Xie (1889) (107). Brevemente, los ratones, fueron anestesiados con isoflurano (5%; 1 L/min O<sub>2</sub>) en una cámara de inducción por 5 min o hasta observar al ratón inconsciente. Luego se traspasó a una manta termorregulada con administración constante de isoflurano (2,5%; 1 L/min O<sub>2</sub>), donde se depiló la piel de la escotadura del nervio ciático. Posteriormente, con material quirúrgico estéril se hizo un corte romo de tejido conectivo y se despegó suavemente el nervio ciático, para hacerle una ligación de nudo doble con lino estéril.

Una vez ligado el nervio ciático, rápidamente se cerró la herida mediante sutura y se le aplicó, de manera tópica, una mezcla de lidocaína clorhidrato 4%, bacitracina/neomicina 5 mg/ 500 U.I y diclofenaco dietilamina 1,16 % en una proporción 1:1:1. En la extremidad contralateral se realizó sólo la exposición del nervio ciático, la cual se utilizó como control de la operación simulada (sham). Para finalizar el procedimiento se les aplicó a los ratones un tratamiento antibiótico y antiinflamatorio sistémico con enrofloxacino (25 mg/Kg de peso del animal) y ketoprofeno (5 mg/ Kg de peso del animal) con inyección subdérmica durante el mismo día y dos días después de la ligación. Una vez terminado el proceso quirúrgico, los ratones con CCI se dispusieron individualmente en jaulas separadas del resto de sus compañeros de jaula con las mismas condiciones que antes de agua, humedad y fotoperiodo (Figura 4).





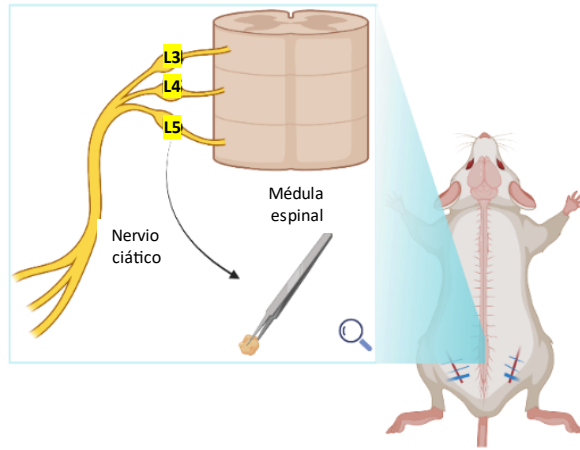
**Figura 4. Procedimiento quirúrgico de CCI.** A los ratones se les indujo anestesia en una cámara de inducción, con isoflurano, para luego generar una apertura en las escotaduras de los ciáticos izquierdo (CCI) y derecho (sham), nervio inervado por prolongaciones de los DRG L4, L5 y L6. Luego se sutura la herida y se le aplica un tratamiento farmacológico.

### 3.2.2. Extracción de GRD, nervio ciático y médula espinal:

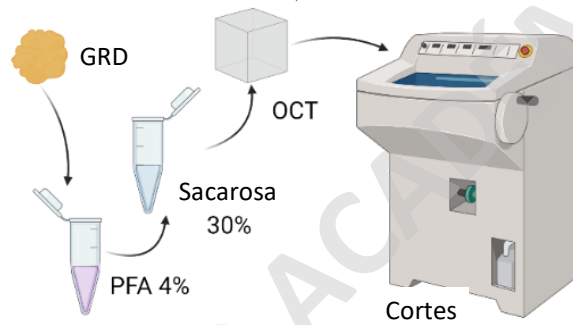
Los ratones fueron eutanasiados con una dosis letal de xilacina/ketamina inyectada intraperitonealmente luego de 7 días de la CCI. Los GRD (L3 a L6) fueron disectados lo más íntegro posible a través de laminectomía (127). Además, se disectó una porción de las aferencias del nervio ciático y la porción de las raíces dorsales de las posiciones lumbares (L3 a L6), que son aquellos GRD que inervan el ciático (129).

### 3.2.3. Inmunofluorescencia de tejidos:

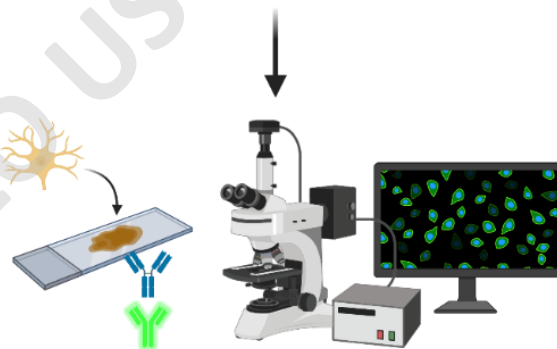
Los tejidos del ratón del lado ligado (ipsi) y expuesto (contra) fueron tratados con método ampliamente utilizado con ligeras variaciones (70,72,88,91,94,108,121,130). Fueron dispuestos en tubos con PFA 4% por 1 h a temperatura ambiente y luego en sacarosa al 30 % por 3 días (o hasta que precipiten). Los tejidos se congelaron en Optimal Cutting Temperature compound (OCT, Sakura Finetek, EUA) y se realizaron cortes de entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de grosor en criostato Microm HM5215 (Thermo Fisher Scientific, Alemania) a  $-20^{\circ}\text{C}$  obteniéndolos en un portaobjeto cargado positivamente Superfrost Plus (WWR, USA) (**Figura 5**). Los GRD fijados en portaobjetos fueron incubados con anticuerpos primarios para analizar su morfología, la expresión de Cdk5, sus activadores y su sustrato p-TRPV1. La incubación de anticuerpos se realizó demarcando con lápiz hidrofóbico el cuadrante donde estaban los cortes, para luego agregar 100  $\mu\text{l}$  de solución de anticuerpos para bloqueo y permeabilización por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Mientras ocurría este proceso se agregaron alícuotas de anticuerpos primarios correspondiente a la dilución mostrada en la **Tabla 1** en el volumen correspondiente al 100  $\mu\text{l}$  por número de cortes. Por consiguiente, se descartó la solución de anticuerpos que permeabilizó el tejido y se les agregaron 100  $\mu\text{l}$  a cada cuadrante demarcado y se incubó por 16 h a  $4^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Al día siguiente, se descartó la solución con anticuerpo y se lavó 3 veces con PBS 1X filtrado, para luego agregar 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpos secundarios correspondientes diluidos como muestra la **Tabla 1** en cada muestra por 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavó 3 veces más con PBS 1X filtrado por 5 min y luego con agua bidestilada por el mismo tiempo en cámara húmeda. Pasado el tiempo, se descartó el líquido de los portaobjetos y se dejaron secando para luego agregarle FluorSave™ Reagent (Merck, Alemania) y un cubreobjetos. Finalmente se dejaron secar horizontalmente a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche para verlos a microscopio confocal.



### Biopsia



### Procesamiento de tejidos



### Inmunofluorescencia

**Figura 5. Análisis *postmortem*.** Los ratones fueron eutanasiados para extraer los DRG L3-L6, para luego fijarlos en solventes y soluciones orgánicas, agregarlo a un medio de incrustación para generar cortes transversales del tejido y colocarlos en un portaobjeto. Una vez en el portaobjeto, el tejido se permeabiliza y bloquea, para agregarle anticuerpos primarios y secundarios que se unan a proteínas del tejido y se puedan observar en el microscopio confocal.

#### 3.2.4. Análisis cuantitativo de las IF:

Para el análisis cuantitativo de estas muestras se utilizó la visualización de las fotos que se sacaron en 40X con aceite de inmersión en el software Fiji/ImageJ (*National Institute of Health, USA*). A mano alzada se realizó el encasillamiento de los cuerpos celulares de GRD, de donde se les sacaron datos de área, media de intensidad, y densidad integrada para cada canal. Para la determinación de la intensidad de fluorescencia diferencial entre los dos tratamientos, se utilizó la siguiente fórmula (70,131):

$$CTCF = IntDen\ i - (Area\ i * Media\ background) \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde CTCF es *Corrected Total Cell Fluorescence* (Fluorescencia celular total corregida); *IntDen*, corresponde a la densidad integrada; *Area*, al área de interés seleccionada; *Media background*, al promedio de las marcas del ruido de la foto en áreas donde no hay fluorescencia aparente; e *i*, corresponde a la marca de interés.

#### 3.2.5. Análisis estadístico:

Para los análisis estadísticos del CTCF se utilizó el software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) y se evaluó la normalidad de las muestras a través de las pruebas de Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov- Smirnov. Además, los datos fueron analizados estadísticamente por la prueba de t no pareada de Mann- Whitney. Los datos se expresaron con su media y su error estándar.  $P < 0,05$  se utilizó para la significancia de las diferencias.

#### 3.2.6. Ética:

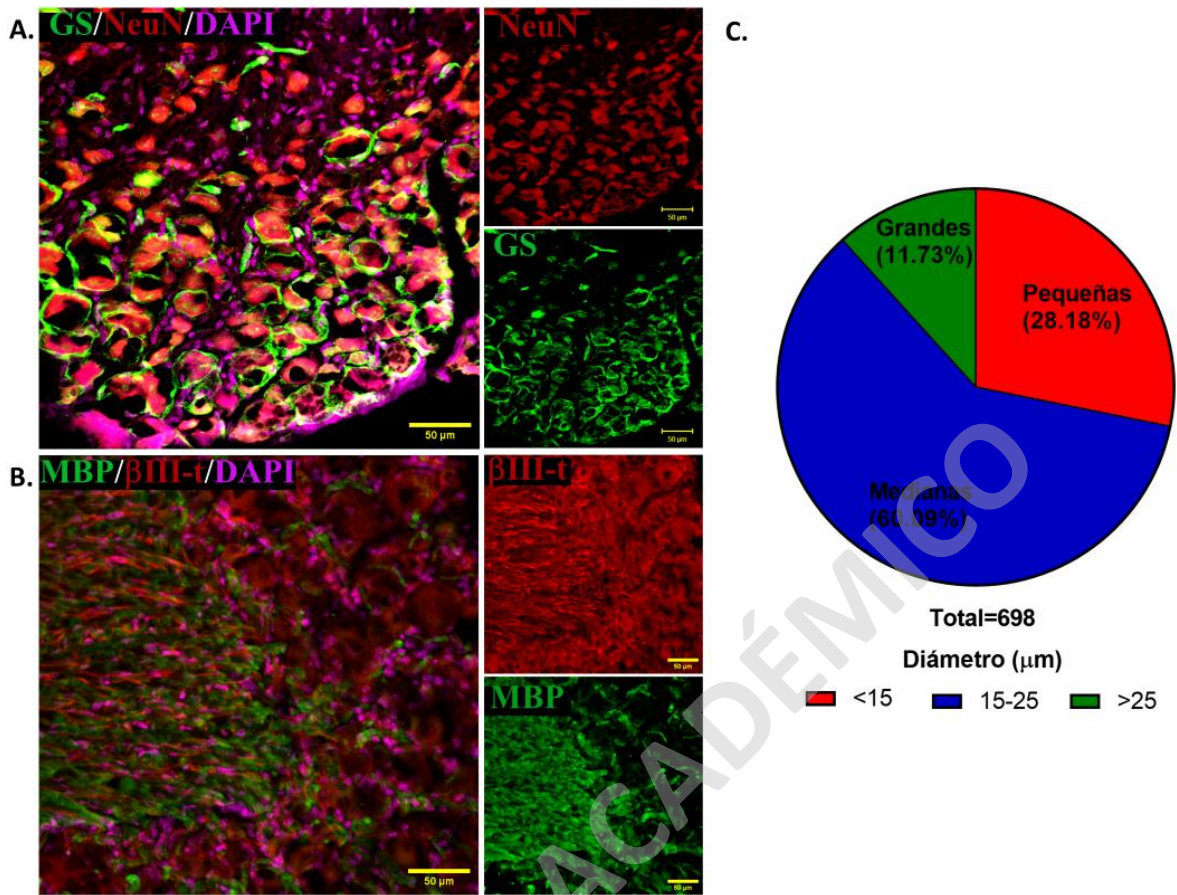
Todos los protocolos se han basado en guías de AVMA 2020 para eutanasia (132), el Protocolo Institucional del Cuidado y Uso de Animales (PICUA) de la Universidad de Chile y los Lineamientos Éticos para la Investigación de Dolor Experimental en Animales Conscientes (133). Protocolo de bioética aprobado N°1928-FCS-UCH a cargo del Dr. Utreras, investigador principal.

## 4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. Análisis de la morfología y los distintos tipos celulares presentes en los GRD (L3-L6) de ratón.

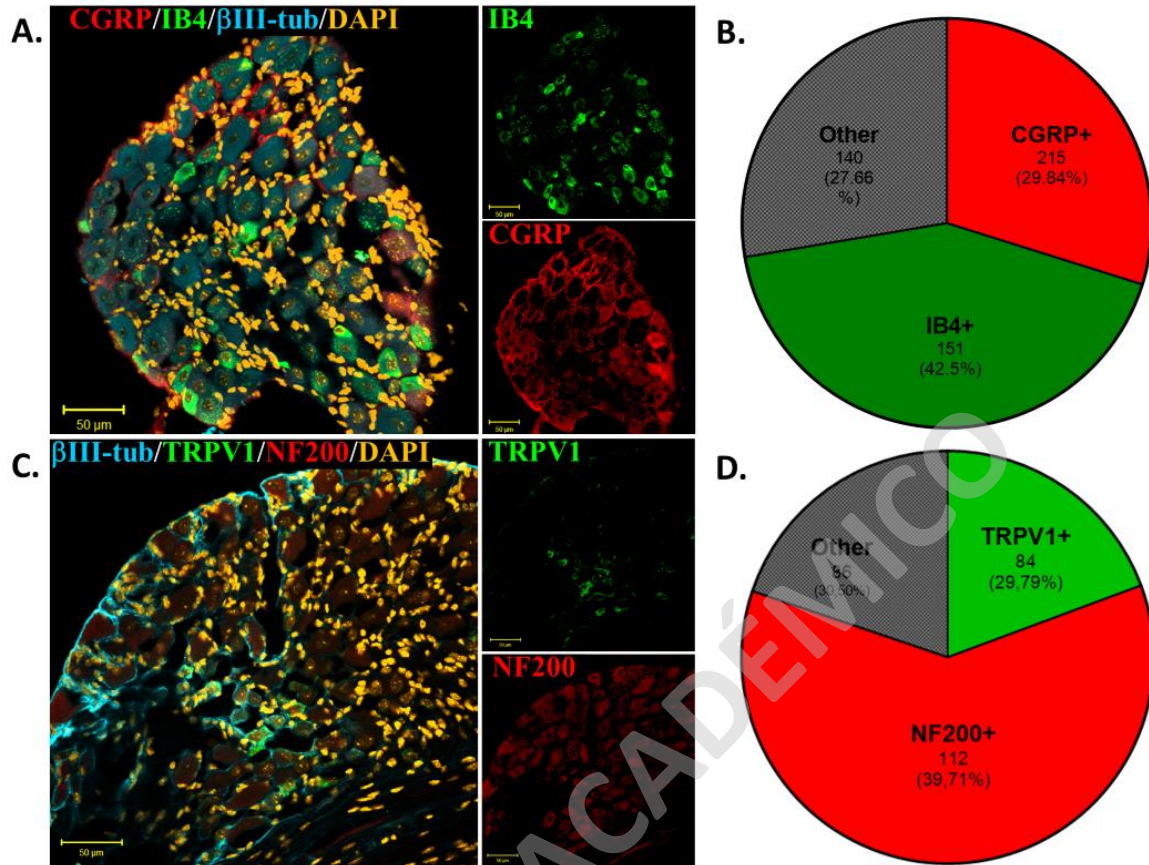
Mediante inmunofluorescencias se caracterizaron las distintas poblaciones celulares presentes en los GRD de ratones mediante el uso de anticuerpos específicos. Como marcador neuronal se utilizó el anticuerpo NeuN (134) que marca el citoplasma de neuronas sensoriales primarias del GRD. Estas neuronas están completamente rodeadas por células satelitales gliales (CSG), reconocidas con el anticuerpo contra glutamina sintetasa (GS) (**Figura 6A**). Por otro lado, se utilizó el anticuerpo contra  $\beta$ III-tubulina, isoforma específica de los microtúbulos de neuronas (135). Además, se usó el anticuerpo contra la proteína básica de mielina (MBP), que marca las células de Schwann, las cuales se encargan de formar la mielina en los axones (**Figura 6B**). También se cuantificó la frecuencia de los diámetros neuronales de 3 ratones en 3 pares de GRD, donde podemos concluir que más de la mitad de la población neuronal presentan un diámetro mayor o igual a los 15  $\mu$ m y menor a los 25  $\mu$ m de diámetro (**Figura 6C**).

Utilizando anticuerpos específicos, se caracterizaron algunas sub-poblaciones neuronales presentes en los GRD. Se utilizó un anticuerpo contra CGRP, un péptido relacionado al gen de calcitonina, presente en neuronas peptidérgicas. Por otro lado, se usó el reactivo de origen vegetal IB4 que reconoce la isolectina B4, la cual marca neuronas no peptidérgicas, que liberan neurotransmisores de origen aminoacídico. Importantly, se observa que ambas marcas no co-localizan, es decir, hay neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas (**Figura 7A**). Además, se cuantificó el número de neuronas positivas para cada una de las marcas, indicando que el porcentaje de neuronas peptidérgicas (CGRP+) corresponde al 29.8%, mientras que la población de neuronas no peptidérgicas (IB4+) corresponde al 42,5% (**Figura 7B**), restando un 27.6% de otros tipos neuronales. Por otro lado, dependiendo del tamaño celular de las neuronas de los GRD, estas se pueden categorizar en pequeñas, medianas y grandes.



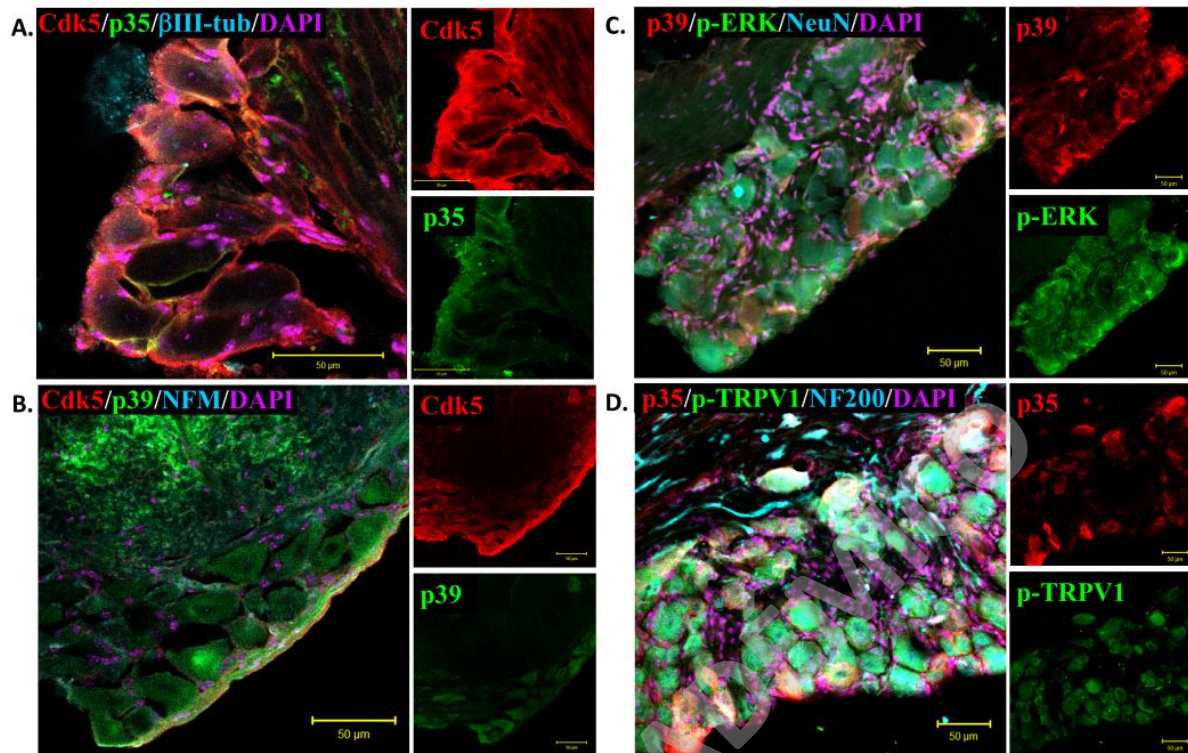
**Figura 6. Identificación de poblaciones celulares en el GRD de ratón.** **A.** Inmunofluorescencia representativa de GRD (L3 a L6) en donde se observa el marcador neuronal NeuN (rojo) y el marcador GS de CSG (verde) **B.** Inmunofluorescencia representativa de GRD (L4 a L6) en donde se observa el marcador neuronas βIII-tubulina (rojo) y el marcador MBP para células de Schwann (verde). Marcador nuclear DAPI. Barra de escala corresponde a 50 μm. **C.** Distribución de neuronas según tamaño. Se contaron 698 neuronas de 3 ratones y se clasificaron según su diámetro en pequeñas (menores a 15 μm), medianas (entre 15 y 25 μm) y grandes (mayores a 25 μm).

Las neuronas pequeñas tienen un diámetro menor a los 15 μm y pueden ser marcadas con el anticuerpo TRPV1+. Por otro lado, las neuronas grandes poseen diámetros mayores a 25 μm y pueden ser marcadas con el anticuerpo NF200 (**Figura 7C**). Del análisis de estas IF se determinó que la distribución de neuronas pequeñas (TRPV1+) representan el 29.8% y las grandes (NF200+) representan el 39.71% de la población (**Figura 7D**), concordando con el análisis de frecuencia de diámetro de la **figura 6C**.



**Figura 7. Diferentes tipos de poblaciones neuronales del GRD de ratón.** **A.** Inmunofluorescencia representativas de neuronas peptidérgicas (CGRP+) y no peptidérgicas (IB4+) en GRD de ratón. **B.** Porcentaje de neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas. **C.** Inmunofluorescencia representativas de neuronas pequeñas (TRPV1+) y neuronas grandes (NF200+). **D.** Porcentaje de neuronas TRPV1+ y NF200+. Se utilizaron entre 1 y 3 GRD de 3 ratones distintos. Se contaron entre 282 y 506 neuronas. Barra de escala corresponde a 50 μm.

Posteriormente, se analizó mediante inmunofluorescencia la vía de señalización de Cdk5 en los GRD de ratones (**Figura 8**). Utilizando los anticuerpos contra Cdk5 y sus activadores, p35 y p39, se determinó que Cdk5 co-inmunolocaliza con p35 (**Figura 8A**) o con p39 (**Figura 8B**) en todas las neuronas de los GRD analizados. Además, se evaluó la activación de la vía MAPK en cortes de GRD de ratones mediante el uso del anticuerpo fosfo-ERK1/2, encontrándose una inmunolocalización basal de esta vía (**Figura 8C**). Finalmente, evaluamos la inmunolocalización de TRPV1 fosforilado por Cdk5, que co-inmunolocaliza con p35 en neuronas de los GRD (**Figura 8D**), sugiriendo que Cdk5 está activo en condiciones basales igual que en los GT analizados por nuestro equipo anteriormente (76).



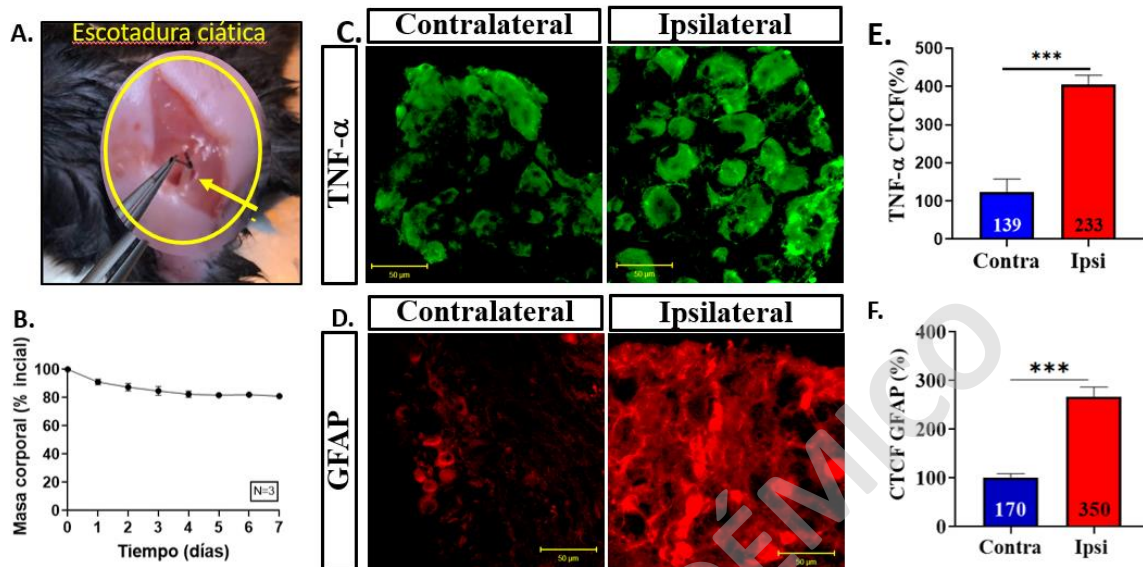
**Figura 8. Marcas de interés en GRD de ratones.** **A.** Inmunofluorescencia representativa de GRD de ratón (L3 a L6) donde se observa Cdk5 (rojo), p35 (verde) y  $\beta$ III-tubulina (cian). **B.** Inmunofluorescencia representativa de GRD (L4 a L6) en donde está a la mira Cdk5 (rojo), p39 (verde) y NFM (cian). **C.** Inmunofluorescencia representativa de GRD (L4 a L6) donde se muestra p39 (Rojo), p-ERK (verde) y NeuN (Cian). **D.** Inmunofluorescencia representativa de GRD (L4 a L6) donde se ven marcas para p35 (rojo), p-TRPV1 (verde) y NF200 (cian). Marcador nuclear DAPI en fucsia. Barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.

#### 4.2. La ligación del nervio ciático produjo una disminución de la masa corporal y aumentó la expresión de los marcadores de inflamación TNF- $\alpha$ y GFAP en los GRD de ratón.

El nervio ciático izquierdo fue ligado con un doble nudo hecho con seda estéril a la altura de la escotadura del ciático (lado ipsilateral). Por su parte, sólo se expuso el nervio ciático derecho a modo de operación simulada o sham (lado contralateral) a modo de control (**Figura 9A**). Durante los 7 días siguientes a la ligación se realizó un monitoreo del peso de los ratones para evaluar el bienestar animal, indicando que los ratones perdieron menos del 20% del peso inicial (**Figura 9B**), por lo que se hace imprescindible el uso de analgésicos según el ANEXO II del PICUA de la Universidad de Chile (**Tabla A1**).



Posteriormente, se evaluaron los marcadores de inflamación (TNF- $\alpha$  y GFAP) en los GRD a los 7 días posteriores a la ligación. Mediante inmunofluorescencias contra TNF- $\alpha$  y GFAP, se demostró que hubo

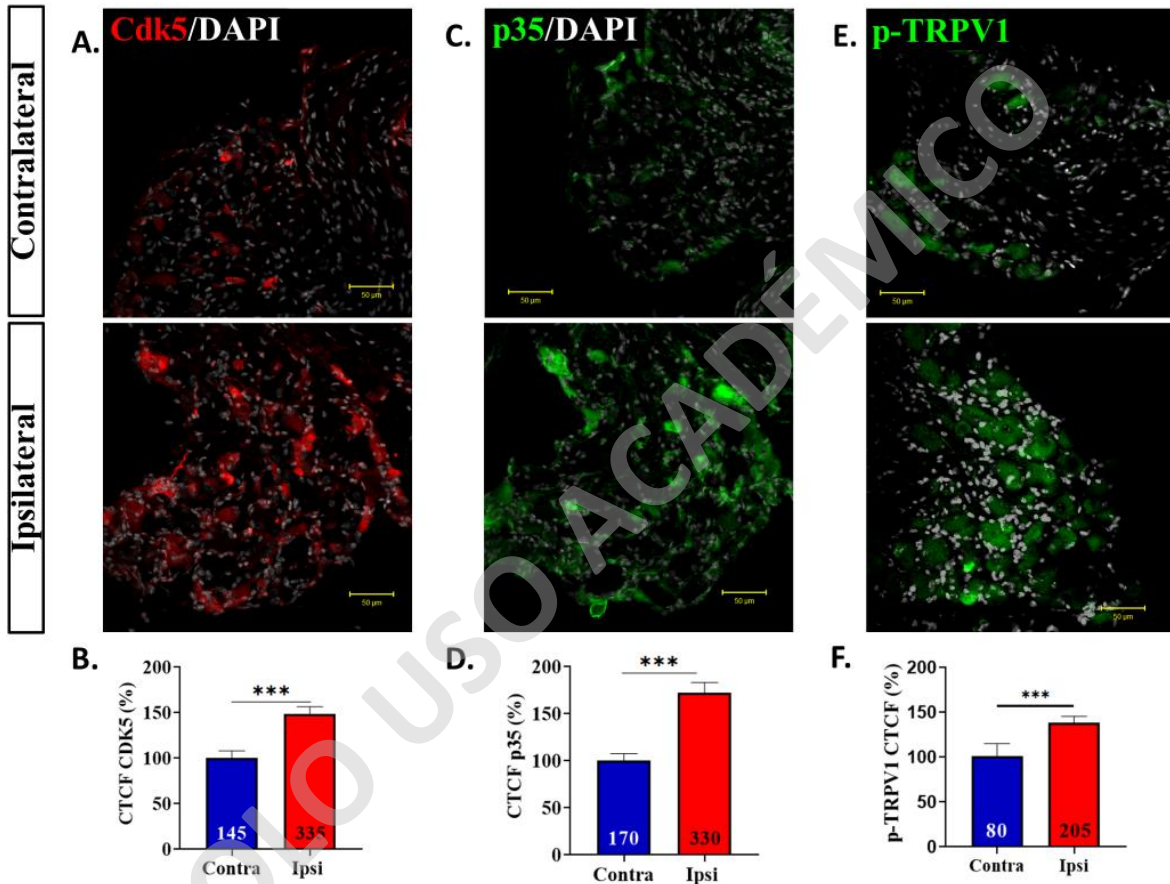


**Figura 9. CCI aumenta los niveles de inmunolocalización de TNF- $\alpha$  y GFAP en los GRD (L3-L6).** A. El nervio ciático del lado ipsilateral fue ligado, mientras que el del lado contralateral fue sólo expuesto (sham). B. Pérdida de peso de ratones hembra adultas luego de 7 días de CCI (n=3). A los 7 días los ratones pierden alrededor del 15%, sin variación entre individuos (las barras de variación no se observan a simple vista) C. Inmunofluorescencia representativa de TNF- $\alpha$  en los GRD que inervan los nervios ciáticos. D. Inmunofluorescencia representativa de GFAP en los GRD que inervan los nervios ciáticos. E. Cuantificación de TNF- $\alpha$  de los GRD (L3-L6) utilizando CTCF. TNF- $\alpha$  aumenta 4 veces su CTCF en el lado ipsilateral respecto al contralateral F. Cuantificación de GFAP de los GRD (L3-L6) utilizando CTCF. GFAP aumenta un 2,5 veces de los valores control en el lado ipsilateral. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 3 ratones CCI. El número de neuronas utilizadas en el análisis se encuentra dentro de las columnas de cada gráfico (135-233 neuronas diferentes analizadas de 3 animales distintos). El análisis estadístico corresponde a test no-paramétrico de Mann-Whitney. \*\*\* p<0.001.

un aumento significativo de ambos marcadores de inflamación en los GRD ligados con respecto a los no ligados (**Figura 9C-D**). Los análisis cuantitativos de la intensidad de fluorescencia comparada determinaron que TNF- $\alpha$  aumentó 4 veces sus niveles basales (**Figura 9E**), mientras que GFAP aumentó su expresión en un 150% sus niveles basales (**Figura 9F**) en el lado ipsilateral respecto al contralateral. Los datos de fluorescencia de célula individual de TNF- $\alpha$  y GFAP dieron una distribución no paramétrica según todos los test de normalidad (**Figura A1A-B**).

**4.3. La ligación del nervio ciático aumentó la expresión de Cdk5, p35 y la actividad de Cdk5 en los GRD de ratones.**

Se evaluaron los componentes de la vía de señalización de Cdk5 en los GRD a los 7 días después de la ligación del nervio ciático. Mediante inmunofluorescencias contra Cdk5 se observó un aumento en



**Figura 10: Ligación del nervio ciático incrementa la actividad de Cdk5.** **A.** Imágenes representativas de Cdk5 en rojo. **B.** CTCF de Cdk5. Cdk5 aumenta un 50% de los valores control en el lado ipsilateral **C.** Imágenes representativas de p35 en verde. **D.** CTCF de p35. p35 aumenta un 75% en el lado ipsilateral respecto al contralateral **E.** Imágenes representativas de p-TRPV1. **F.** CTCF de p-TRPV1. Indican un claro aumento del 40% en el lado ipsilateral respecto al contralateral. El número de neuronas utilizadas en el análisis se encuentra dentro de las columnas de cada gráfico (80-205 neuronas diferentes analizadas). En blanco DAPI. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 3 ratones CCI. El número de neuronas utilizadas en el análisis se encuentra dentro de las columnas de cada gráfico (80-205 neuronas diferentes analizadas de 3 animales distintos) La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. El análisis estadístico corresponde a test no-paramétrico de Mann-Whitney. \*\*\*  $p < 0.001$ .

la inmunolocalización de Cdk5 (**Figura 10A**) en los GRD del lado ipsilateral respecto al contralateral, mostrando que sus niveles de detección aumentaron en un 50% de su estado basal en el lado ipsilateral (**Figura 10B**). Por su parte, se observó un aumento significativo en la inmunolocalización de p35 (**Figura 10C**), donde se observa que aumenta en un 75% su intensidad de fluorescencia en el lado con CCI respecto al lado control (**Figura 10D**). Con respecto a p-TRPV1 (**Figura 10E**), se pudo observar que los niveles de fosforilación aumentan alrededor de un 40% en los GRD del lado ipsilateral respecto al contralateral (**Figura 10F**). En resumen, estos resultados demuestran que la ligación del nervio ciático durante 7 días incrementó la expresión y actividad de Cdk5 en los GRD (L3-L6) del lado ligado respecto al lado contralateral, lo que sugiere que este tipo de ligación es un buen modelo para estudiar la función de Cdk5 en DN. Los datos de fluorescencia célula individual de Cdk5, p35 y p-TRPV1 dieron una distribución no paramétrica según todos los test de normalidad (**Figura A1C-E**)

SOLO USO ACADÉMICO

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análisis anatómico mediante inmunofluorescencias de los GRD lumbares (L3-L6) permitió no sólo una caracterización parcial de las distintas poblaciones celulares y sub-poblaciones neuronales que inervan el ciático, sino también mejorar la técnica de extracción y manipulación de estos tejidos. La cantidad de GRD depende de la especie y línea genética utilizada. Por ejemplo, cuando se utilizan ratones, se ha observado que algunas líneas genéticas poseen 5 secciones lumbares en su segmentación nerviosa con respecto a otras con 6 secciones (136). Los ratones que se utilizaron en este trabajo son de la línea genética mixta C57BL/6 y poseen en su mayoría 6 secciones lumbares en su segmentación y por lo tanto 6 GRD lumbares. Sin embargo, se observó que algunos ratones presentan una fusión variable de la última sección lumbar con la primera sacral, y aun en menor cantidad, individuos con sólo 5 secciones. Cabe señalar que en futuros experimentos será necesario observar individuo a individuo la cantidad de porciones lumbares que tiene. Interesantemente, la mayor contribución del nervio ciático en ratones corresponde a los GRD L3 a L5 en ratones, en mayor cantidad el L4 mientras que en menor cantidad L5. La contribución del GRD L6 al nervio ciático es casi nula según este estudio (136). En el caso de las disecciones presentadas, se extrajeron las porciones lumbares L3, L4, L5 Y L6. Por lo tanto, en algunos análisis no dieron diferencias significativas en la medición de inmunolocalización de distintos marcadores por IF, posiblemente ya que se pudo haber analizado los GRD del L6 (resultados no mostrados), puesto que se no se pudieron diferenciar cada ganglio una vez fuera del animal. En ratas en cambio, es distinto puesto que todos los individuos tienen 6 secciones lumbares y la inervación del ciático se transloca hacia una sección más abajo, siendo la sección L5 con mayor contribución, seguida de la L4 y finalmente la L6. De hecho, otros estudios han demostrado que una ligación de los nervios espinales L5-L6 genera cambios relacionados a DN en ratones C57/BL6 (110).

La CCI en ratones ha sido ampliamente utilizada para estudiar el DN (101,107–110,122,123). La CCI fue propuesto por Bennett & Xie en 1988 (107). Este modelo consistía en la ligación con 4 ligaduras con tripa crómica separadas por 1 mm. Sin embargo, ha servido de referencia y ha tenido distintas modificaciones (101–103,109,113,124,125). En este trabajo se utilizó hilo quirúrgico no degradable y no inflamatorio, con una sola ligación y con doble nudo para prevenir que se suelte, pudiendo afectar significativamente el modelo de dolor respecto al original u otros propuestos con más ligaciones en el nervio ciático simultáneamente, por ejemplo. Las aproximaciones de este método sirven para simular una típica lesión de compresión (por trauma o tumores, por ejemplo), afectando las fibras más periféricas, ideal, también, para simular síndrome de túnel carpal (102).

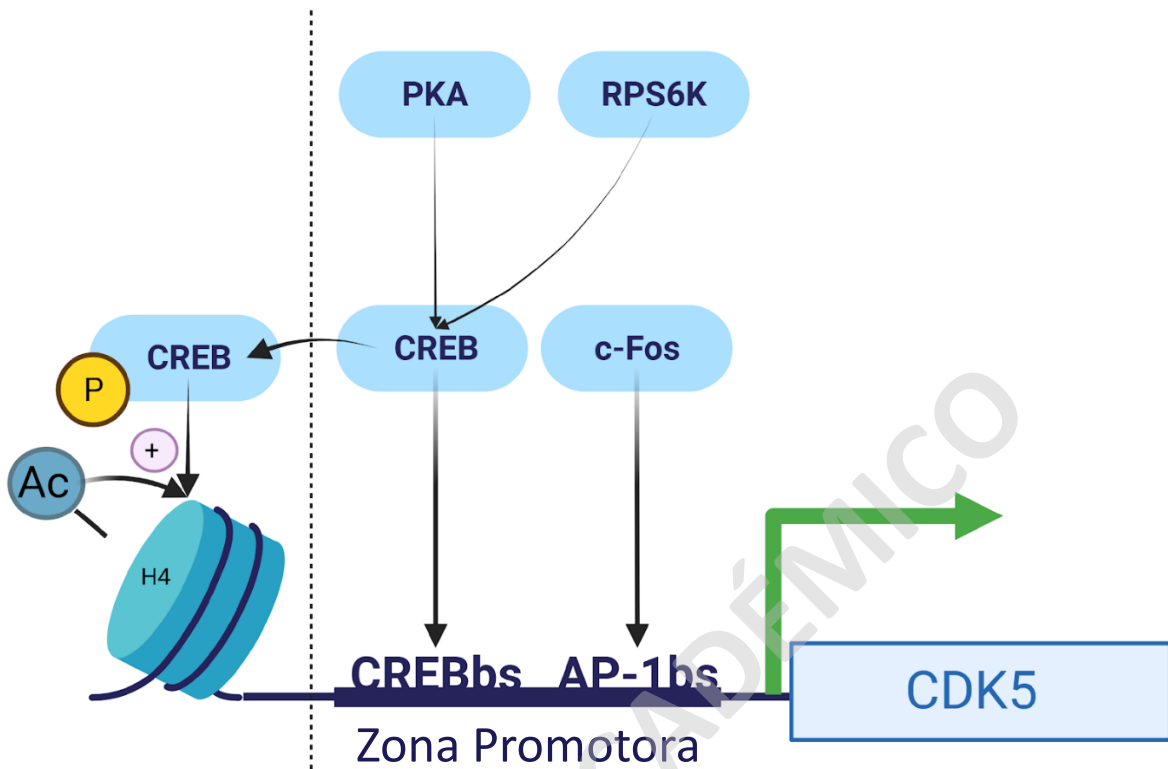
Durante el desarrollo embrionario, las neuronas periféricas de bajo umbral (mecanorreceptores y propioceptores) se desarrollan primeramente desde la cresta neural y forman los GRD. Por su parte, los nociceptores se desarrollan tardíamente, expresando TrkA, un receptor de NGF, y Runx1 (137). Luego del desarrollo, las neuronas se diferencian en peptidérgicas (CGRP+) y no peptidérgicas (IB4+). Adicional a estos marcadores diferenciales, Wolf & Ma (2007) evidenciaron que en la segregación que genera la diferenciación neuronal, las neuronas peptidérgicas conservan la expresión de TrkA y también se puede observar la presencia de sustancia P, un neurotransmisor peptidérgico; mientras que aquellas neuronas no peptidérgicas conservan Runx1, siendo este último necesario para la diferenciación no-peptidérgica (137). Esto indica que TrkA y Runx1 también servirían como marcadores de subpoblaciones de nociceptores distintos, pudiendo analizarse en próximas inmunofluorescencias para mayor especificidad, en vez de IB4 y CGRP.

Para determinar que los animales sienten dolor como tal, y no sólo hablar de nocicepción, es necesario implementar distintos experimentos de comportamiento animal, como test de dolor mecánico o térmico. Al analizar las alteraciones neuronales, bioquímicas y cognitivas, se puede observar que la progresión en el tiempo de DN varía bajo distintos estímulos (109). A nivel cognitivo, se observó que los ratones con CCI presentan alodinia mecánica y deterioro motor desde los 7 días en adelante. Así como un máximo de la disminución en la coordinación motora a los 7 días después de la CCI. Estos datos nos sugieren que luego de 7 días después de una CCI, el DN ya está presente. Sin embargo, en este estudio no se mencionó nada a nivel de SNP.

En esta investigación se pudo demostrar que la CCI por 7 días aumentó tanto la expresión de Cdk5 y p35, como la fosforilación de TRPV1 en T407 (p-TRPV1), residuo específico que fosforila Cdk5 (128). Interesantemente, se demostró hace poco que ratones mutantes que expresan TRPV1 mutado en T407A (TRPV1<sup>T407A</sup>) presentan una reducida respuesta a dolor inducido por capsaicina en bajas dosis, así como un aumento en la tolerancia a calor, dando a entender que el bloqueo de la actividad de Cdk5 sobre TRPV1 tiene una implicancia fisiológica sobre el dolor (130). A su vez, en el artículo original de la generación del anticuerpo contra p-TRPV1, los autores demostraron que Cdk5 fosforila a TRPV1 en T407 y que la inhibición de la actividad de Cdk5 atenuó el influjo de calcio mediado por TRPV1. Adicionalmente, la delección condicional de Cdk5 en neuronas sensoriales de pequeño diámetro (nociceptivas) previene la fosforilación de TRPV1 e induce a la hipoalgesia, es decir, menor sensación de dolor (128). Estos antecedentes son claves para entender la interacción entre Cdk5 y TRPV1 en dolor, y porque se correlaciona con elevados niveles la actividad quinasa sobre este sustrato en un modelo de dolor neuropático.

Interesantemente se ha demostrado un aumento de Cdk5 en los GRD que inervan el nervio ciático luego de 14 días una lesión en ratas (73,90). La literatura indica que, luego de una CCI incrementan los niveles de AMP cíclico en la asta dorsal de la médula espinal, lo que causa un aumento en los niveles del factor de transcripción CREB (**Figura 11**), que se une al promotor de Cdk5 aumentando su expresión en las neuronas. Además, la fosforilación de CREB permitiría la acetilación de histonas que interactúan con el gen *Cdk5*, lo que también facilitaría su expresión (81,138). Adicionalmente, se ha visto que c-fos, otro factor de transcripción, también posee afinidad con la zona promotora del gen *Cdk5*, y que la sobreexpresión de esta proteína induciría un aumento en la expresión de Cdk5 (**Figura 11**) (81,139). Por otro lado, se reportó que el ketoprofeno, un fármaco utilizado para el bien estar animal post-operatorio en este trabajo, inhibe la expresión de c-fos en la medula espinal (140), mas no hay evidencia del efecto de este fármaco sobre la expresión y/o actividad de Cdk5 en neuronas sensoriales..

Se ha demostrado con numerosas evidencias que la actividad quinasa de Cdk5 depende predominante de la expresión de p35 (67,68,71,72,76,77,79,80,84–86,88–90,92,100,110,130,141). Sin embargo, hay otras formas de regular la actividad de Cdk5 que pueden contribuir a aumentarla o disminuirla. Por ejemplo, existe una proteína que es la subunidad reguladora 1 de Cdk5 (CDK5rap1), que se expresa en neuronas del SNC y actúa como un inhibidor endógeno de Cdk5. Además, se ha observado que la expresión de CDK5rap1 disminuye en un modelo de DN por CCI a través de la regulación epigenética ejercida por un ARN no codificante de la familia piRNA (110). Por otro lado, se ha observado que la actividad de Cdk5 es regulada por semaforina 3 a través de la unión a su receptor de membrana NP-1 y Plexin-A en la corteza cerebral. Esta vía causa la activación de la proteína Fyn, tirosina quinasa que fosforila Cdk5 en Y15, la cual a su vez regula el cito-esqueleto neuronal (142). A pesar de esto, pareciera ser que la principal vía de activación sería a través de p35 en el SNP. Por su parte, en condiciones de DN, Cdk5 también podría ser regulada por la unión de su fragmento proteolítico de p25 el cual deslocalizaría Cdk5 y aumentaría su actividad (141).



**Figura 11: Regulación de la expresión génica de Cdk5.** CREB y c-Fos son los principales reguladores de la transcripción de Cdk5, uniéndose a la región promotora del gen. Además, la fosforilación de CREB permitiría la acetilación de la histona H4, facilitando espacialmente la unión de polimerasas al ADN codificante. Elaboración propia a partir de (81,138,139).

Aun cuando se tengan estos antecedentes respecto a Cdk5, es importante considerar que el DN es un cuadro patológico bastante complejo donde hay múltiples interacciones moleculares y celulares que permiten la sensibilización tanto a nivel periférico como central, y que en las peores circunstancias tiende a ser crónico (16–19,47–49,61,62,96,108,110,121,126,143,144). En general, la sensibilización periférica y central se genera por una expresión y/o transporte diferencial de canales-receptores catiónicos en neuronas y por sus modificaciones postraduccionales que afectan sus umbrales de activación (145–148). También se entiende que el rol de detección de estímulos dolorosos es dado por sub-poblaciones de neuronas específicas llamadas nociceptores (149). Por su parte, mediadores inflamatorios inducen el reclutamiento de células inmunes a los GRD, en donde producen y liberan citoquinas proinflamatorias, sensibilizando las neuronas sensoriales de los GRD (16,53,121). Sin embargo, hay varias problemáticas como diferentes síntomas provocados por distintos orígenes del

DN, diferencias entre los organismos modelo (cepa, sexo, edad) con los pacientes clínicos, y la cantidad de comorbilidades asociadas, hacen que aún no hayan tratamientos suficientemente efectivos para el DN. Actualmente, se proyecta un aumento del DN en conjunto con otros desafíos globales como el envejecimiento, el cáncer, la tolerancia y pobre eficacia de los tratamientos actuales (144), dejando clara la urgencia por más inversión en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos para tratar el DN. Interesantemente, se ha demostrado que la transferencia de mitocondrias serviría como terapia para aliviar parcialmente el dolor inflamatorio, aunque más investigaciones hacen falta para llevarlo a la clínica (54), pudiendo ser uno de los más novedosos mecanismos por los cuales se pueda aliviar el DN y que valdría la pena investigar y ver si hay relaciones espaciales o funcionales con Cdk5, sus activadores o sus sustratos.

SOLO USO ACADÉMICO



## 6. CONCLUSIONES

El DN es un importante tópico de investigación que afecta alrededor del 10% de la población. En este trabajo, se extrajeron GRD de ratones y se caracterizaron por inmunofluorescencia secciones de estos tejidos nociceptivos implicados en la primera vía de señalización de la nocicepción. Posteriormente, estandarizamos un modelo de dolor neuropático en ratones hembra adultos luego de la ligación del nervio ciático. A los 7 días de CCI demostramos un aumento en la inmunolocalización de mediadores inflamatorios en los GRD, y un aumento significativo en la expresión de Cdk5 y p35, además de un incremento en la actividad quinasa de Cdk5 (p-TRPV1) en los GRD del lado ligado con respecto al sin ligar. Estos resultados sugieren el establecimiento de un proceso de sensibilización periférica que ocurre durante el DN. Este trabajo de tesis fue el primer paso para poder adentrarse en los signos y mecanismos del DN tales como la detección de proteínas involucradas por ensayos bioquímicos, comportamiento doloroso espontáneo o inducido, y los mecanismos celulares y moleculares que guían la iniciación y progresión del dolor, con la finalidad última de encontrar tratamientos eficaces, con la menor cantidad de efectos secundarios y que sean seguros, cómodos y accesibles para la población general.

Como conclusión general se acepta la hipótesis propuesta, aunque se hace imperativo seguir trabajando en distintos experimentos que permitan corroborar de una manera conjunta los resultados presentados.

## 7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS

La estandarización de un modelo de dolor neuropático en este laboratorio ha permitido que, tanto en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo como en grupo asociativo MiNusPain, se generen discusiones en torno a los resultados obtenidos y acerca de las distintas líneas de investigación de grupos asociados al núcleo milenio. Además, han permitido discutir protocolos o diseños experimentales en común y diferentes. A parte, permitirá que quienes sigan trabajando con este modelo de DN puedan estudiar el efecto de distintas proteínas que estén involucradas en DN, que interactúen con Cdk5/p35 o sus sustratos, y que permitan la investigación y desarrollo de futuros terapias que tengan menores costos y efectos secundarios, potencie la economía nacional y permita la interacción con investigadores a nivel global.

En conjunto con esto, se hace imperante que con el mismo modelo, y ya teniendo claras las falencias que se pudieron presentar, podamos obtener resultados reproducibles y confiables con otras herramientas de la biología molecular y biotecnología, como Western Blot, qPCR, electrofisiología, neuronas en cultivos primarios, analizar la ganancia y pérdida de función con hibridación *in situ*, a través de modelos transgénicos Cre-loxP disponibles en el laboratorio o con tecnología de vanguardia como CRISPR-cas9. También se hace importante dilucidar las diferencias en comportamiento que puedan presentar los animales modelo (a través de pruebas de comportamiento como la prueba mecánica de Von Frey, térmicas o cognitivas) si es que hay un bloqueo de la actividad de Cdk5 o la delección de esta proteína o su activador.

Finalmente, no está demás destacar que aún se sigue haciendo ciencia básica en esta área para dilucidar los mecanismos por los cuales participa Cdk5 en DN, pero que con el transcurso del tiempo, y a pasos cada vez más acelerados, se puedan desarrollar colaboraciones y procesos que permitan utilizar herramientas formuladas a partir de nuestra investigación para el desarrollo de fármacos o terapias, ya sean farmacológicas, celulares o mitocondriales, que permitan llevar la investigación al mercado a través de patentes y productos que puedan ser entregados en los servicios de salud públicas o privadas y logren tener un impacto social, abaratando los costos de tratamientos, aumentando la expectativa de vida y, lo mejor de todo, mejorando la calidad de vida de enfermedades que tienden a ser crónicas y donde el dolor no les permite proseguir con su vida de forma normal.

## 8. REFERENCIAS

1. IASP Taxonomy Committee. Terminology. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>. 2011.
2. Tracey I, Dickenson A. Snapshot: Pain Perception. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1308-1308.e2.
3. Mercer Lindsay N, Chen C, Gilam G, Mackey S, Scherrer G. Brain circuits for pain and its treatment. *Sci Transl Med*. 2021 Nov 10;13(619).
4. Masic D, Liang E, Long C, Sterk EJ, Barbas B, Rech MA. Intravenous Lidocaine for Acute Pain: A Systematic Review. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2018 Dec 9;38(12):1250–9.
5. Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*. 2019 Jan;160(1):19–27.
6. Linton SJ, Flink IK, Vlaeyen JWS. Understanding the Etiology of Chronic Pain From a Psychological Perspective. *Phys Ther*. 2018 May 1;98(5):315–24.
7. Nicholas M, Vlaeyen JWS, Rief W, Barke A, Aziz Q, Benoliel R, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain*. 2019 Jan;160(1):28–37.
8. Sá KN, Moreira L, Baptista AF, Yeng LT, Teixeira MJ, Galhardoni R, et al. Prevalence of chronic pain in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Pain Rep*. 2019 Nov;4(6):e779.
9. Miranda JP, Quezada P, Caballero P, Jiménez L, Morales A, Bilbeny N, et al. Revisión Sistemática: Epidemiología de Dolor Crónico No Oncológico en Chile. [Internet]. 2013 [cited 2022 Aug 7]. Available from: <https://www.revistaeldolor.cl/numero-59/revision-sistemica-epidemiologia-de-dolor-cronico-no-oncologico-en-chile>
10. Bilbeny N, Miranda JP, Eberhard ME, Ahumada M, Méndez L, Orellana ME, et al. Survey of chronic pain in Chile – prevalence and treatment, impact on mood, daily activities and quality of life. *Scand J Pain*. 2018 Jul 26;18(3):449–56.

11. Durán J, Tejos-Bravo M, Cid V, Ferreccio C, Calvo M. Chronic pain in Chile: first prevalence report of noncancer chronic pain, fibromyalgia, and neuropathic pain and its associated factors. *Pain*. 2023 Mar 9;Pain.
12. Adams MCB. Chronic Pain Management in General and Hospital Practice. *Anesth Analg* [Internet]. 2021 Feb 14;132(2):e19–e19. Available from: <https://journals.lww.com/10.1213/ANE.0000000000005312>
13. Cousins MJ, Gallagher RM. Fast Facts: Chronic and Cancer Pain [Internet]. 3rd ed. Vol. 1. Oxford: Health Press; 2015 [cited 2022 Nov 14]. Available from: [https://books.google.cl/books?id=619uDwAAQBAJ&pg=PP1&dq=Fast+Facts+Chronic+and+Cancer+Pain&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjLppn7m6\\_7AhVVqJUCHRGIB2IQ6AF6BAGHEAI#v=onepage&q=Fast%20Facts%20Chronic%20and%20Cancer%20Pain&f=false](https://books.google.cl/books?id=619uDwAAQBAJ&pg=PP1&dq=Fast+Facts+Chronic+and+Cancer+Pain&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjLppn7m6_7AhVVqJUCHRGIB2IQ6AF6BAGHEAI#v=onepage&q=Fast%20Facts%20Chronic%20and%20Cancer%20Pain&f=false)
14. Thai V, Fainsinger RL. Palliative Care (2nd edition). 2011;(Chapter 7):97–114.
15. Inquimbert P, Scholz J. Basic Neurochemistry. 2012.
16. Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiol Rev* [Internet]. 2021 Jan 1;101(1):259–301. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00045.2019>
17. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain [Internet]. Vol. 429, *European Journal of Pharmacology*. 2001. Available from: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)
18. Petzke F, Tölle T, Fitzcharles MA, Häuser W. Cannabis-Based Medicines and Medical Cannabis for Chronic Neuropathic Pain. Vol. 36, *CNS Drugs*. Adis; 2022. p. 31–44.
19. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Dec 21;3(1):17002.
20. Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira D, et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain*. 2011 Jan;152(1):14–27.
21. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. Vol. 5, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2019.

22. Rosenberger DC, Blechschmidt V, Timmerman H, Wolff A, Treede RD. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. Vol. 127, *Journal of Neural Transmission*. Springer; 2020. p. 589–624.
23. Hall BE, Macdonald E, Cassidy M, Yun S, Sapio MR, Ray P, et al. Transcriptomic analysis of human sensory neurons in painful diabetic neuropathy reveals inflammation and neuronal loss. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
24. Orellana Silva M, Yañez V, Hidalgo G, Valenzuela F, Saavedra R. NEUROPATHIC PAIN SECTION Original Research Articles 5% Lidocaine Medicated Plaster Use in Children with Neuropathic Pain from Burn Sequelae [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/painmedicine/article/14/3/422/1859710>
25. Miranda S, Gayoso C, Ruiz P, Halabi D. Prevalence of neuropathic symptoms in patients referred for temporomandibular disorder in a Chilean hospital, 2014-2015. *Journal Oral Of Research*. 2015 Aug 4;4(4):263–9.
26. Ojeda A, Calvo A, Cuñat T, Mellado Artigas R, Comino- Trinidad O, Aliaga J, et al. Incidence of New-Onset Pain, Characteristics and Influence on Health-Related Quality of life in COVID-19 Survivors After Critical Illness. Analysis of the PAIN COVID Clinical Trial cohort. 2020 [cited 2022 Jul 28]; Available from: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-125421/v1/e1104728-981f-4763-b90a-409d9b23096d.pdf?c=1631866682>
27. Attal N, Martinez V, Bouhassira D. Potential for increased prevalence of neuropathic pain after the COVID-19 pandemic. Vol. 6, *Pain Reports*. Lippincott Williams and Wilkins; 2021.
28. Waxman SG. Sistemas somatosensoriales en Neuroanatomía clínica. 26th ed. Padilla G, Olivares S, editors. Vol. 1. Ciudad de México DF: Mc Graw Hill Educación; 2011. 195–200 p.
29. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001 Sep;413(6852):203–10.
30. Lumpkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. Vol. 445, *Nature*. Nature Publishing Group; 2007. p. 858–65.

31. Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, Matusica D. Human dorsal root ganglia. Vol. 13, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2019.
32. Liem L, van Dongen E, Huygen FJ, Staats P, Kramer J. The dorsal root ganglion as a therapeutic target for chronic pain. Vol. 41, *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 511–9.
33. Shiers SI, Sankaranarayanan I, Jeevakumar V, Cervantes A, Reese JC, Price TJ. Convergence of peptidergic and non-peptidergic protein markers in the human dorsal root ganglion and spinal dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology*. 2021 Jul 1;529(10):2771–88.
34. Marucci G, Dal Ben D, Buccioni M, Martí Navia A, Spinaci A, Volpini R, et al. Update on novel purinergic P2X3 and P2X2/3 receptor antagonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat*. 2019 Dec 2;29(12):943–63.
35. Bevan S, Quallo T, Andersson DA. TRPV1. In 2014. p. 207–45.
36. North RA. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. Vol. 554, *Journal of Physiology*. 2004. p. 301–8.
37. Chen SP, Qin T, Seidel JL, Zheng Y, Eikermann M, Ferrari MD, et al. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain*. 2017 Jun 1;140(6):1643–56.
38. Kaczmarek LK. Slack, Slick, and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN Neurosci*. 2013 May 13;2013:1–14.
39. Peeters PJ, Aerssens J, de Hoogt R, Stanisz A, Göhlmann HW, Hillsley K, et al. Molecular profiling of murine sensory neurons in the nodose and dorsal root ganglia labeled from the peritoneal cavity. *Physiol Genomics* [Internet]. 2006;24:252–63. Available from: <http://physiolgenomics.physiology.org>
40. Li CL, Li KC, Wu D, Chen Y, Luo H, Zhao JR, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res*. 2016 Jan 1;26(1):83–102.

41. Sharma N, Flaherty K, Lezgiyeva K, Wagner DE, Klein AM, Ginty DD. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature*. 2020 Jan 16;577(7790):392–8.
42. Woolf CJ. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Vol. 152, Pain*. 2011.
43. Felten DL, Anil NS. Capítulo 14: Sistema sensitivos. Netter. *Atlas de Neurociencia*. 2nd ed. Barcelona: Elsevier España; 2010. 323–356 p.
44. Portenoy R, Cruciani R, Argoff C. Neuropathic pain. *Pain Management Secrets E-Book*. Philadelphia: Mosby, Inc.; 2009.
45. Hanson P, Maddison JE. *Small Animal Clinical Pharmacology*. Elsevier Health Sciences; 2008.
46. Sun P. *Management of Postoperative Pain with Acupuncture*. ilustrada. Elsevier Health Sciences; 2007.
47. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Vol. 9, The Lancet Neurology*. 2010. p. 807–19.
48. Zilliox LA. Neuropathic Pain. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2017 Apr;23(2):512–32.
49. Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, Haroutounian S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Vol. 21, Current Pain and Headache Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2017.
50. Connors BW, Bear MF, Paradiso MA. *Neuroscience Exploring the Brain*. In: 4th ed. Wolters Kluwer; 2016. p. 437–52.
51. Hanani M, Spray DC. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2020 Sep 22;21(9):485–98.
52. Woodham P, Anderson PN, Nadim W, Turmaine M. Satellite cells surrounding axotomised rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein. *Neurosci Lett*. 1989 Mar;98(1):8–12.

53. Yu X, Liu H, Hamel KA, Morvan MG, Yu S, Leff J, et al. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
54. van der Vlist M, Raouf R, Willemsen HJ, Prado J, Versteeg S, Martin Gil C, et al. Macrophages transfer mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain. *Neuron*. 2022 Feb 16;110(4):613-626.e9.
55. Burnstock G. Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. Vol. 5, *Molecular Pain*. 2009.
56. Iftinca M, Defaye M, Altier C. TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions. *Drugs*. 2021 Jan 9;81(1):7–27.
57. Lu R, Metzner K, Zhou F, Flauaus C, Balzulat A, Engel P, et al. Functional Coupling of Slack Channels and P2X3 Receptors Contributes to Neuropathic Pain Processing. *International Journal of Molecular Sciences Article* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22010405>
58. Hildebrand ME, Mezeyova J, Smith PL, Salter MW, Tringham E, Snutch TP. Identification of sodium channel isoforms that mediate action potential firing in lamina I/II spinal cord neurons [Internet]. 2011. Available from: <http://www.molecularpain.com/content/7/1/67>
59. Zhou F, Metzner K, Engel P, Balzulat A, Sisignano M, Ruth P, et al. Slack Potassium Channels Modulate TRPA1-Mediated Nociception in Sensory Neurons. *Cells*. 2022 May 19;11(10):1693.
60. Kerckhove N, Mallet C, François A, Boudes M, Chemin J, Voets T, et al. Cav3.2 calcium channels: The key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol. *Pain*. 2014 Apr;155(4):764–72.
61. Ma W, Quirion R. The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2005 Aug 5;9(4):699–713.
62. Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. Vol. 3, *Molecular Pain*. 2007.



63. Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, Valsecchi V, Bonny C, Rossi F, et al. Role of JNK Isoforms in the Development of Neuropathic Pain following Sciatic Nerve Transection in the Mouse. *Mol Pain*. 2012 Jan 1;8:1744-8069-8-39.
64. Ma Y, Chen J, Yu D, Wei B, Jin H, Zeng J, et al. cAMP-PKA signaling is involved in regulation of spinal HCN channels function in diabetic neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2021 Apr 17;750.
65. Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. Vol. 55, *Pharmacological Research*. 2007. p. 578–89.
66. Chen Y, Luo F, Yang C, Kirkmire CM, Wang ZJ. Acute Inhibition of Ca<sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Reverses Experimental Neuropathic Pain in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009 Aug;330(2):650–9.
67. Utreras E, Futatsugi A, Pareek TK, Kulkarni AB. Molecular roles of Cdk5 in pain signaling. Vol. 6, *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. Elsevier Ltd; 2009. p. 105–11.
68. Pao PC, Tsai LH. Three decades of Cdk5. Vol. 28, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd; 2021.
69. Kwak Y, Jeong J, Lee S, Park YU, Lee SA, Han DH, et al. Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) regulates the function of CLOCK protein by direct phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Dec 27;288(52):36878–89.
70. Rozas P, Lazcano P, Piña R, Cho A, Terse A, Pertusa M, et al. Targeted overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  increases cyclin-dependent kinase 5 activity and TRPV1-dependent Ca<sup>2+</sup> influx in trigeminal neurons. *Pain*. 2016 Jun 1;157(6):1346–62.
71. Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, et al. Cdk5/p35 Regulates Neurotransmitter Release through Phosphorylation and Downregulation of P/Q-Type Voltage-Dependent Calcium Channel Activity. 2002.
72. Moutal A, Ji Y, Ji Y, Bellampalli SS, Bellampalli SS, Khanna R, et al. Differential expression of Cdk5-phosphorylated CRMP2 following a spared nerve injury. *Mol Brain*. 2020 Jun 22;13(1).
73. Gomez K, Vargas-Parada A, Duran P, Sandoval A, Delgado-Lezama R, Khanna R, et al. L5-6 Spinal Nerve Ligation-induced Neuropathy Changes the Location and Function of

- Ca<sup>2+</sup> Channels and Cdk5 and Affects the Compound Action Potential in Adjacent Intact L4 Afferent Fibers. *Neuroscience*. 2021 Sep 1;471:20–31.
74. Coddou C, Sandoval R, Castro P, Lazcano P, Hevia MJ, Rokic M, et al. Cyclin-dependent kinase 5 modulates the P2X<sub>2</sub> receptor channel gating through phosphorylation of C-terminal threonine 372. *Pain*. 2017 Nov 1;158(11):2155–68.
  75. Utreras E, Futatsugi A, Rudrabhatla P, Keller J, Iadarola MJ, Pant HC, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates cyclin-dependent kinase 5 activity during pain signaling through transcriptional activation of p35. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Jan 23;284(4):2275–84.
  76. Utreras E, Keller J, Terse A, Prochazkova M, Iadarola MJ, Kulkarni AB. Transforming growth factor- $\beta$ 1 regulates Cdk5 activity in primary sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 May 11;287(20):16917–29.
  77. Utreras E, Prochazkova M, Terse A, Gross J, Keller J, Iadarola MJ, et al. TGF- $\beta$ 1 sensitizes TRPV1 through Cdk5 signaling in odontoblast-like cells. *Mol Pain*. 2013 May 13;9(1).
  78. Prochazkova M, Terse A, Amin ND, Hall B, Utreras E, Pant HC, et al. Activation of cyclin-dependent kinase 5 mediates orofacial mechanical hyperalgesia [Internet]. 2013. Available from: <http://www.molecularpain.com/content/9/1/66>
  79. Sharma S, Sicinski P. A kinase of many talents: Non-neuronal functions of CDK5 in development and disease. *Open Biol*. 2020 Jan 1;10(1).
  80. Wang J, Liu SH, Fu YP, Wang JH, Lu YM. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci*. 2003 Oct 1;6(10):1039–47.
  81. Gomez K, Vallecillo TGM, Moutal A, Perez-Miller S, Delgado-Lezama R, Felix R, et al. The role of cyclin-dependent kinase 5 in neuropathic pain. *Pain* [Internet]. 2020 Dec 1;161(12):2674–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32773603>
  82. Lee M sum, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 2000 May;405(6784):360–4.

83. Asada A, Yamamoto N, Gohda M, Saito T, Hayashi N, Hisanaga SI. Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J Neurochem*. 2008 Aug;106(3):1325–36.
84. Shah K, Rossie S. Tale of the Good and the Bad Cdk5: Remodeling of the Actin Cytoskeleton in the Brain. Vol. 55, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2018. p. 3426–38.
85. Park J, Seo J, Won J, Yeo HG, Ahn YJ, Kim K, et al. Abnormal mitochondria in a non-human primate model of MPTP-induced Parkinson's disease: DRp1 and CDK5/p25 signaling. *Exp Neurobiol*. 2019 Jun 1;28(3):414–24.
86. Fukasawa JT, de Labio RW, Rasmussen LT, de Oliveira LC, Chen E, Villares J, et al. CDK5 and MAPT Gene Expression in Alzheimer's Disease Brain Samples. *Curr Alzheimer Res*. 2018 Jan 3;15(2):182–6.
87. Dobrowolny G, Aucello M, Molinaro M, Musarò A. Local expression of mlgf-1 modulates ubiquitin, caspase and CDK5 expression in skeletal muscle of an ALS mouse model. *Neurol Res*. 2008 Mar 1;30(2):131–6.
88. Sandoval R, Lazcano P, Ferrari F, Pinto-Pardo N, González-Billault C, Utreras E. TNF- $\alpha$  increases production of reactive oxygen species through Cdk5 activation in nociceptive neurons. *Front Physiol*. 2018 Feb 6;9(FEB).
89. Zhu X, Yue L, Fan C, Liu Y, Wang Y, Zhao H. Mechanism of Cdk5-synaptophysin-SNARE pathway in acute and chronic inflammatory pain [Internet]. Vol. 13, *Am J Transl Res*. 2021. Available from: [www.ajtr.org](http://www.ajtr.org)
90. Gomez K, Calderón-Rivera A, Sandoval A, González-Ramírez R, Vargas-Parada A, Ojeda-Alonso J, et al. Cdk5-dependent phosphorylation of CaV3.2 T-type channels: Possible role in nerve ligation-induced neuropathic allodynia and the compound action potential in primary afferent C fibers. *Journal of Neuroscience*. 2020 Jan 8;40(2):283–96.
91. Su SC, Seo J, Pan JQ, Samuels BA, Rudenko A, Ericsson M, et al. Regulation of N-type Voltage-Gated Calcium Channels and Presynaptic Function by Cyclin-Dependent Kinase 5. *Neuron*. 2012 Aug 23;75(4):675–87.

92. Nair A, Simonetti M, Fabbretti E, Nistri A. The Cdk5 kinase downregulates ATP-gated ionotropic P2X3 receptor function via serine phosphorylation. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 May;30(4):505–9.
93. Chernov A v., Remacle AG, Hullugundi SK, Cieplak P, Angert M, Dolkas J, et al. Amino acid sequence conservation of the algescic fragment of myelin basic protein is required for its interaction with CDK5 and function in pain. *FEBS Journal*. 2018 Sep 1;285(18):3485–502.
94. Yang L, Gu X, Zhang W, Zhang J, Ma Z. Cdk5 inhibitor roscovitine alleviates neuropathic pain in the dorsal root ganglia by downregulating N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A. *Neurological Sciences*. 2014;35(9):1365–71.
95. Inoue H, Kuroda H, Ofusa W, Oyama S, Kimura M, Ichinohe T, et al. Functional coupling between the p2x7 receptor and pannexin-1 channel in rat trigeminal ganglion neurons. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 1;22(11).
96. Casey SL, Atwal N, Vaughan CW. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. *Pain*. 2017;158(12):2452–60.
97. Hirokawa T, Horie T, Fukiyama Y, Mimura M, Takai S, Kida T, et al. Roscovitine, a cyclin-dependent kinase-5 inhibitor, decreases phosphorylated tau formation and death of retinal ganglion cells of rats after optic nerve crush. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 1;22(15).
98. Meijer' L, Borgne' A, Mulner' O, Chong' JPJ, Blow2 JJ, Inagaki' N, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. Vol. 243, *Eur. J. Biochem*. 1997.
99. Cicenias J, Kalyan K, Sorokinas A, Stankunas E, Levy J, Meskinyte I, et al. Roscovitine in cancer and other diseases. Vol. 3, *Annals of Translational Medicine*. AME Publishing Company; 2015.
100. Utreras E, Terse A, Keller J, Iadarola MJ, Kulkarni AB. Resveratrol inhibits Cdk5 activity through regulation of p35 expression. *Mol Pain*. 2011 Jul 7;7.
101. Forouzanfar F, Sadeghnia HR, Hoseini SJ, Ghorbani A, Ghazavi H, Ghasemi F, et al. Fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells

- modulate apoptosis and inflammation in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2020 Apr 1;19(4):151–9.
102. Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *International Journal of Neuroscience*. 2015 Mar 4;125(3):170–4.
  103. Sousa AM, Lages GV, Pereira CL, Slullitel A. Experimental models for the study of neuropathic pain. *Revista Dor*. 2016;17.
  104. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. Vol. 25, *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2011. p. 1–28.
  105. Harrison M, O'Brien A, Adams L, Cowin G, Ruitenber MJ, Sengul G, et al. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *Neuroimage*. 2013 Mar;68:22–9.
  106. Watson C, Kayalioglu G. The organization of the spinal cord. In: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas*. revisada. San Diego, CA: Academic Press; 2009. p. 1–6.
  107. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Vol. 33, *Pain*. 1988.
  108. Xia LP, Luo H, Ma Q, Xie YK, Li W, Hu H, et al. GPR151 in nociceptors modulates neuropathic pain via regulating P2X3 function and microglial activation. *Brain*. 2021 Nov 1;144(11):3405–20.
  109. Medeiros P, de Freitas RL, Boccella S, Iannotta M, Belardo C, Mazzitelli M, et al. Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice. *J Neurosci Res*. 2020 Feb 1;98(2):338–52.
  110. Zhang C, Sha H, Peng Y, Wang Y, Liu C, Zhou X. PiRNA-DQ541777 Contributes to Neuropathic Pain via Targeting Cdk5rap1. *The Journal of Neuroscience*. 2019 Nov 6;39(45):9028–39.
  111. Wang Y, Li CM, Han R, Wang ZZ, Gao YL, Zhu XY, et al. PCC0208009, an indirect IDO1 inhibitor, alleviates neuropathic pain and co-morbidities by regulating synaptic plasticity of ACC and amygdala. *Biochem Pharmacol*. 2020 Jul;177:113926.

112. Drop M, Jacquot F, Canale V, Chaumont-Dubel S, Walczak M, Satała G, et al. Neuropathic pain-alleviating activity of novel 5-HT<sub>6</sub> receptor inverse agonists derived from 2-aryl-1H-pyrrole-3-carboxamide. *Bioorg Chem.* 2021 Oct;115:105218.
113. Moon HC, Heo WI, Kim YJ, Lee D, Won SY, Kim HR, et al. Optical inactivation of the anterior cingulate cortex modulate descending pain pathway in a rat model of trigeminal neuropathic pain created via chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *J Pain Res.* 2017 Oct 3;10:2355–64.
114. Brumovsky P, Villar MJ, Hökfelt T. Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. *Exp Neurol.* 2006 Jul;200(1):153–65.
115. Frank T, Nawroth P, Kuner R. Structure–function relationships in peripheral nerve contributions to diabetic peripheral neuropathy. Vol. 160, *Pain*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. S29–36.
116. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi M, Jamshidi S, Farhangi A, Allah Verdi A, et al. INDUCTION OF DIABETES BY STREPTOZOTOCIN IN RATS. Vol. 22, *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2007.
117. Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. A New Animal Model of Vincristine-Induced Nociceptive Peripheral Neuropathy. *Neurotoxicology.* 2003;24(6):797–805.
118. Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli M, Tredici P, Marmioli P, Minoia C, et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat [Internet]. 2001. Available from: [www.ejconline.com](http://www.ejconline.com)
119. Szilvassy J, Sziklai I, Racz T, Horvath P, Rabloczky G, Szilvassy Z. Impaired bronchomotor responses to field stimulation in guinea-pigs with cisplatin-induced neuropathy [Internet]. Vol. 403, *European Journal of Pharmacology.* 2000. Available from: [www.elsevier.nl/locate/ejphar](http://www.elsevier.nl/locate/ejphar)
120. Joseph EK, Chen X, Khasar SG, Levine JD. Novel mechanism of enhanced nociception in a model of AIDS therapy-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Pain.* 2004 Jan;107(1):147–58.

121. Schmidt D, Díaz P, Muñoz D, Espinoza F, Nystrom A, Fuentes I, et al. Characterisation of the pathophysiology of neuropathy and sensory dysfunction in a mouse model of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Pain*. 2022 Oct 1;163(10):2052–60.
122. Baptista-de-Souza D, Rodrigues Tavares LR, Canto-de-Souza L, Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A. Behavioral, hormonal, and neural alterations induced by social contagion for pain in mice. *Neuropharmacology*. 2022 Feb 1;203.
123. Derangula K, Javalgekar M, kumar Arruri V, Gundu C, kumar Kalvala A, kumar A. Probulcol attenuates NF- $\kappa$ B/NLRP3 signalling and augments Nrf-2 mediated antioxidant defence in nerve injury induced neuropathic pain. *Int Immunopharmacol*. 2022 Jan 1;102.
124. Bilbrey JA, Ortiz YT, Felix JS, McMahon LR, Wilkerson JL. Evaluation of the terpenes  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -terpineol, and  $\gamma$ -terpinene in the mouse chronic constriction injury model of neuropathic pain: possible cannabinoid receptor involvement. *Psychopharmacology (Berl)*. 2022 May 1;239(5):1475–86.
125. Chang HX, Zhao YF. Protocatechuic acid as an inhibitor of the JNK/CXCL1/CXCR2 pathway relieves neuropathic pain in chronic constriction injury rats. *Bosn J Basic Med Sci*. 2022 Apr 1;22(2):217–28.
126. Choi JG, Choi SR, Kang DW, Kim J, Park JB, Lee JH, et al. Sigma-1 receptor increases intracellular calcium in cultured astrocytes and contributes to mechanical allodynia in a model of neuropathic pain. *Brain Res Bull*. 2022 Jan 1;178:69–81.
127. Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc*. 2007 Feb;2(1):152–60.
128. Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Agarwal N, Kuner R, Pant HC, et al. Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1 [Internet]. 2006. Available from: <https://www.pnas.org>
129. Fan M, Mi R, Yew DT, Chan WY. Analysis of Gene Expression Following Sciatic Nerve Crush and Spinal Cord Hemisection in the Mouse by Microarray Expression Profiling. *Cell Mol Neurobiol*. 2001;21(5):497–508.

130. Cho A, Hall B, Limaye AB, Wang S, Chung MK, Kulkarni AB. Nociceptive signaling through TRPV1 is regulated by Cdk5-mediated phosphorylation of T407 in vivo. *Mol Pain*. 2022 Apr 21;174480692211114.
131. Fitzpatrick M. Measuring Cell Fluorescence using ImageJ [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 23]. Available from: <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html#measuring-cell-fluorescence-using-imagej>
132. Underwood W, Anthony R. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 1st ed. Vol. 30. Schaumburg (Illinois): American Veterinary Medical Association; 2020.
133. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983 Jun;16(2):109–10.
134. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. Vol. 53, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2016. p. 1637–47.
135. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. Class III  $\beta$ -Tubulin Isotype: A Key Cytoskeletal Protein at the Crossroads of Developmental Neurobiology and Tumor Neuropathology. *J Child Neurol*. 2003 Dec 2;18(12):851–66.
136. Rigaud M, Gemes G, Barabas ME, Chernoff DI, Abram SE, Stucky CL, et al. Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: Implications for studies of neuropathic pain. *Pain*. 2008 May;136(1):188–201.
137. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*. 2007 Aug;55(3):353–64.
138. Li K, Zhao GQ, Li LY, Wu GZ, Cui S sen. Epigenetic upregulation of Cdk5 in the dorsal horn contributes to neuropathic pain in rats. *Neuroreport*. 2014 Oct 1;25(14):1116–21.
139. Lee JH, Kim KT. Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase a pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *J Neurochem*. 2004 Nov;91(3):634–47.



140. Buritova J, Honore' P, Besson JM. Ketoprofen produces profound inhibition of spinal c-Fos protein expression resulting from an inflammatory stimulus but not from noxious heat. *Pain*. 1996 Oct;67(2):379–89.
141. Hwang J, Namgung U. Phosphorylation of STAT3 by axonal Cdk5 promotes axonal regeneration by modulating mitochondrial activity. *Exp Neurol*. 2021 Jan;335:113511.
142. Sasaki Y, Cheng C, Uchida Y, Nakajima O, Ohshima T, Yagi T, et al. Fyn and Cdk5 Mediate Semaphorin-3A Signaling, Which Is Involved in Regulation of Dendrite Orientation in Cerebral Cortex. *Neuron*. 2002 Aug;35(5):907–20.
143. Bouhassira D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. Vol. 175, *Revue Neurologique*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 16–25.
144. Calvo M, Davies AJ, Hébert HL, Weir GA, Chesler EJ, Finnerup NB, et al. The Genetics of Neuropathic Pain from Model Organisms to Clinical Application. *Neuron*. 2019 Nov;104(4):637–53.
145. Delmas P. SnapShot: Ion Channels and Pain. Vol. 134, *Cell*. Elsevier B.V.; 2008.
146. Pina R, Ugarte G, Campos M, Inigo-Portugues A, Olivares E, Orio P, et al. Role of trpm8 channels in altered cold sensitivity of corneal primary sensory neurons induced by axonal damage. *Journal of Neuroscience*. 2019 Oct 9;39(41):8177–92.
147. Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, Fajardo O, et al. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun*. 2014 Jan 20;5.
148. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Stefan Kaczmarek J, Delling M, et al. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18114–9.
149. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. Vol. 55, *Neuron*. 2007. p. 353–64.

## 9. ANEXOS

**Tabla A1. Anexo II protocolo CICUA para investigación en animales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.** "Protocolo de supervisión para Roedores modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985) (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985). Este protocolo puede ser ajustado según los requerimientos y capacidades del investigador". En negrita se marcaron puntuación acuñada a animales del trabajo.

<b>Protocolo de supervisión para roedores de laboratorio</b>		
<b>Variable</b>	<b>Rangos</b>	<b>Puntuación</b>
<b>Pérdida de peso (de 0 a3)</b>	● Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente).	0
	● Pérdida de peso inferior al 10%.	1
	● Pérdida de peso entre el 10% y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de heces.	2
	● Pérdida de peso superior al 20%, el animal con consume agua ni alimento.	3
<b>Aspecto (de 0 a3)</b>	● Normal.	0
	● Pelo en mal estado.	1
	● Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.	2
	● Postura anormal.	3
<b>Comportamiento espontáneo (de 0 a3)</b>	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Inactividad	2
	● Automutilación, vocalización anormales, animales muy inquieto o inmóviles.	3
<b>Comportamiento en respuesta a manipulación (de 0 a3)</b>	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Cambios moderados	2
	● Animales agresivo o comatoso	3
<b>Constantes Vitales (de 0 a3)</b>	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Cambios en la temperatura corporal de 1-2°C, incremento del 30% en frecuencia Cardiac a o respiratoria.	2
	● Cambios en la temperatura corporal de >2°C, incremento del 50% en frecuencia Cardiac a o respiratoria.	3
<b>Puntuación Total</b>		<b>7</b>

**Nota:** cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro todas las 3 pasan a 4.

**Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:**

**Puntuación:**

Desde 0-4

normal

Desde 5-9

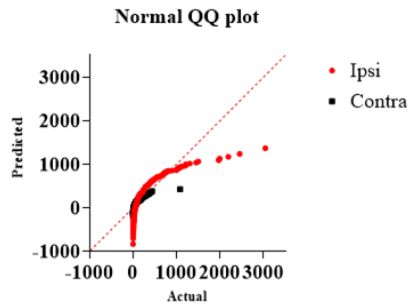
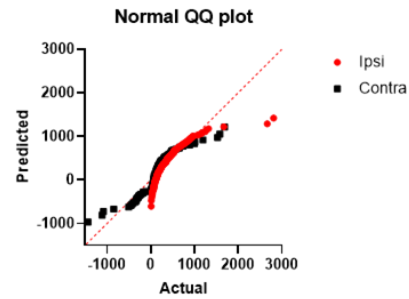
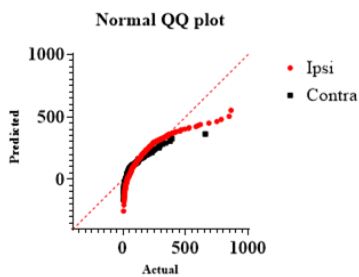
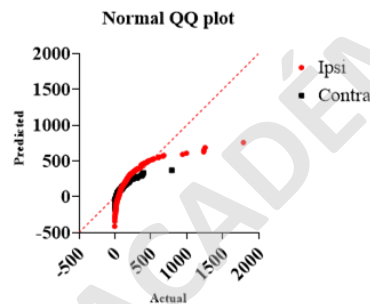
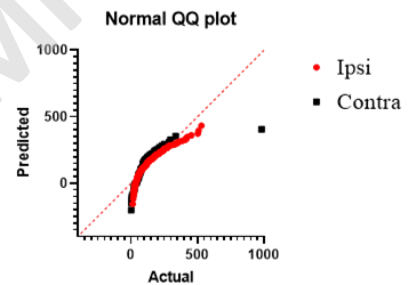
supervisar cuidadosamente considerar el uso de analgésicos

Desde 10-14

sufrimiento intenso: administrar analgésicos (¿eutanasia?)

Desde 15-20

eutanasia

**A. GFAP****B. TNF- $\alpha$** **C. Cdk5****D. p35****E. p-TRPV1**

**Figura A1:** Distribución de los datos de la intensidad de fluorescencia de cada célula cuantificada para GFAP (A), TNF- $\alpha$  (B); Cdk5 (C), p35 (D) y p-TRPV1 (E). Estos datos lanzaron que, según todas las pruebas de normalidad, al menos una de las condiciones estudiadas (el lado CCI ipsilateral, “ipsi” en rojo; y el contralateral, “contra” en negro) poseen una distribución no paramétrica, dato que nos permite utilizar un test de estudiante no pareado y no paramétrico. En este caso, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para todas las muestras.